

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie
Geschäftsführender Direktor Prof. Dr. E. Weihe

des Fachbereiches Medizin der Philipps-Universität Marburg

Titel der Dissertation:

**Vesikulärer Transfer („Transsekretion“) von
Membrankomponenten auf bovine
Nebenhodenspermien**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten
Humanbiologie dem Fachbereich Medizin der Phillips- Universität Marburg

vorgelegt von:

Anja Schwarz (geb. Richter) aus Halle/ Saale

Marburg, 2011

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps- Universität Marburg
am:

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. M. Rothmund

Referent: PD Dr. B. Wilhelm

Korreferent: Prof. Dr. Dr. J. Daut

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	II
Abbildungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis	X
Abkürzungsverzeichnis	XII
1 Einleitung	1
1.1 Männlicher Reproduktionstrakt.....	1
1.1.1 Morphologie und Funktion des bovinen Hodens	1
1.1.2 Morphologie und Funktion des Nebenhodens	2
1.1.3 Spermatogenese	5
1.1.4 Morphologie des Spermiums.....	6
1.1.5 Reifungsprozess der Spermien im Nebenhoden	7
1.2 Sekretionsmechanismen im männlichen Reproduktionstrakt.....	10
1.2.1 Apokrine Sekretion der männlichen akzessorischen Geschlechtsdrüsen.....	10
1.2.2 Epididymosomen - Apokrin sekretierte Vesikel des Nebenhodens	13
1.2.3 Prostatasomen der humanen Prostata	14
1.3 Plasmamembran- Ca^{2+} -ATPase (PMCA)	15
1.3.1 Kalzium - ein Regulator für zelluläre Prozesse	15
1.3.2 Allgemeine Funktion der PMCA	17
1.3.3 Regulation der Plasmamembran- Ca^{2+} -ATPase.....	20
1.3.4 Bedeutung der Kalziumregulation in den Spermien	22
1.4 Zielsetzung der Arbeit	22
2 Material und Methoden	24
2.1 Material	24
2.2 Tiermaterial	24
2.3 Methoden	25
2.3.1 Biochemische Methoden	25
2.3.1.1 Gewinnung boviner Nebenhodenvesikel (Epididymosomen) und Nebenhodenspermien.....	25
2.3.1.2 Herstellung einer Mikrosomenfraktion	27

2.3.1.3	Proteinbestimmung.....	28
2.3.1.4	<i>In vitro</i> Fusion boviner Spermien mit Octadylrhodamin B markierten Epididymosomen.....	28
2.3.1.5	Biotinylierung von Epididymosomen, <i>in vitro</i> Fusionierung und Detektion von biotinylierten Proteinen.....	30
2.3.1.6	<i>In vitro</i> Fusion von Nebenhodenspermien mit unmarkierten Epididymosomen	31
2.3.1.7	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	32
2.3.1.8	Coomassie-Blau-Färbung von Proteingelen.....	33
2.3.1.9	Westernblot-Analyse	34
2.3.1.10	Bestimmung der Mg^{2+} -abhängigen und -unabhängigen Ca^{2+} -ATPase-Aktivität	36
2.3.1.11	Reinigung von PDC-109 aus dem Bläschendrüsensekret des Bullen	37
2.3.1.12	Lipidanalyse	38
2.3.1.12.1	Lipidextraktion nach Thomas R. Appel	38
2.3.1.12.2	Dünnschichtchromatographie	39
2.3.1.12.3	Phospholipidbestimmung nach Fiske-Subarrow.....	41
2.3.1.12.4	Manuelle Cholesterolbestimmung nach Liebermann-Burchardt	42
2.3.2	Morphologische Methoden	43
2.3.2.1	Immunzytochemische Färbung an bovinen Spermatozoen	43
2.3.2.2	Transelektronenmikroskopie.....	44
2.3.3	Statistische Auswertung	44
3	Ergebnisse	45
3.1	Charakterisierung boviner Epididymosomen.....	45
3.1.1	Morphologie boviner Epididymosomen	45
3.1.2	Lipidzusammensetzung boviner Epididymosomen	47
3.1.3	Nachweis von PMCA, PMCA4 und PMCA4a in bovinen Epididymosomen	49
3.1.4	Ca^{2+} -ATPase-Aktivität boviner Epididymosomen.....	51
3.2	<i>In vitro</i> Fusion boviner Nebenhodenspermien mit Epididymosomen.....	53
3.2.1	Übertragung von Octadylrhodamin B nach <i>in vitro</i> Fusion	53

3.2.2 Lipidzusammensetzung boviner Spermatozoen vor und nach <i>in vitro</i> Fusion mit Epididymosomen	58
3.2.3 Übertragung von Proteinen auf die Spermienplasmamembran durch <i>in vitro</i> Fusion mit Epididymosomen	63
3.2.3.1 Detektion von PMCA Isoformen in bovinen Nebenhodenspermien vor und nach <i>in vitro</i> Fusion mit Epididymosomen	66
3.2.3.2 Untersuchung der Ca^{2+} -ATPase-Aktivität boviner Nebenhodenspermien.....	71
4 Diskussion.....	75
4.1 Morphologische Charakterisierung boviner Epididymosomen.....	75
4.2 Transfer von Membranbestandteilen von Epididymosomen auf Nebenhodenspermien durch <i>in vitro</i> Fusion	79
4.3 Veränderung der Lipidzusammensetzung boviner Spermatozoen während der Passage durch den Nebenhoden und nach <i>in vitro</i> Fusion mit bovinen Epididymosomen	82
4.3.1 Lipidzusammensetzung boviner Epididymosomen	82
4.3.2 Wie verändert sich die Lipidzusammensetzung von Nebenhodenspermien im Verlauf der Nebenhodenpassage und nach <i>in vitro</i> Fusion mit bovinen Epididymosomen?.....	83
4.4 Wird die Plasmamembran- Ca^{2+} -ATPase von Epididymosomen auf Spermien übertragen?	87
4.4.1 Proteinübertragung von Epididymosomen auf die Spermienmembran.....	87
4.4.2 Übertragung der Plasmamembran- Ca^{2+} -ATPase auf die Spermienmembran.....	89
4.4.3 Physiologische Bedeutung der PMCA4 Spleißvarianten in bovinen Epididymosomen und Spermien.....	94
4.5 Besteht ein funktioneller Zusammenhang zwischen der Ca^{2+} -ATPase-Aktivität und der Lipidzusammensetzung boviner Epididymosomen und der Spermienmembran?	96
5 Zusammenfassung/ Summary	100
6 Literaturverzeichnis	104

7 Anhang.....	118
---------------	-----

Tabellarischer Lebenslauf

Verzeichnis der akademischen Lehrer

Danksagung

Ehrenwörtliche Erklärung

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Schematische Darstellung von Hoden und Nebenhoden	3
Abb. 2:	Schematische Darstellung von epithelialen Zellen der <i>Ductuli efferentes</i> und des <i>Ductus epididymidis</i>	4
Abb. 3:	Schematischer Aufbau eines Bullenspermiums.....	7
Abb. 4:	Sekretionsmechanismen im männlichen Reproduktionstrakt	11
Abb. 5:	Schema einer Plasmamembran- Ca^{2+} -Pumpe (PMCA).....	18
Abb. 6:	Schematischer Reaktionszyklus des Kalziumtransportes der Zelle mittels PMCA.....	19
Abb. 7:	Gewinnung boviner Nebenhodenvesikel und Nebenhodenspermien aus dem Nebenhodensekret über verschiedene Zentrifugations- und Waschschrte	26
Abb. 8:	Reinigung von Nebenhodenspermien über einen diskontinuierlichen Iodixanol-Gradienten (OptiPrep)	27
Abb. 9:	Schematische Darstellung zur Funktionsweise von Octadylrhodamin B (R18)	30
Abb. 10:	Schematische Darstellung eines Nass-Blot-Aufbaus zum Proteintransfer (Biorad)	34
Abb. 11:	Schema zur Lipidextraktion	39
Abb. 12:	Ultrastrukturelle Analyse von apokrin sekretierten Vesikeln des <i>Caput epididymidis</i> und der <i>Cauda epididymidis</i>	45
Abb. 13:	Westernblot-Analyse (12%iges Gel; Invitrogen) unter Verwendung eines Antikörpers gegen MIF an Nebenhodenvesikeln (15 μg) des <i>Caput epididymidis</i> und der <i>Cauda epididymidis</i>	46
Abb. 14:	Westernblot-Analyse (12%iges Gel; Invitrogen) unter Verwendung eines Antikörpers gegen LDH an Nebenhodenvesikeln (30 μg) des <i>Caput epididymidis</i> und der <i>Cauda epididymidis</i>	47
Abb. 15:	Lipidzusammensetzung boviner Epididymosomen.....	48
Abb. 16:	Dünnschichtchromatographische Auftrennung extrahierter Lipide boviner Epididymosomen des Caput (1) und des Cauda Segmentes (2).....	48

Abb. 17: Densitometrische Auswertung der durch Dünnschichtchromatographie aufgetrennten Phospholipide boviner Epididymosomen des Caput und des Cauda Segmentes	49
Abb. 18: Auftrennung der Proteine von Caput und Cauda Epididymosomen im SDS-Gel (7,5%) und Färbung der Proteine mit Coomassie-Blau...	50
Abb. 19: Westernblot-Analyse (7,5%iges Gel) von PMCA, PMCA4 und PMCA4a an Nebenhodenvesikeln (15 µg) des <i>Caput epididymidis</i> (Spur: 1) und der <i>Cauda epididymidis</i> (Spur: 2)	51
Abb. 20: Mg ²⁺ -abhängige und -unabhängige Ca ²⁺ -ATPase-Aktivität boviner Nebenhodenvesikel mit und ohne Zugabe von 20 µg PDC-109	52
Abb. 21: <i>In vitro</i> Fusion boviner Nebenhodenspermien (s) bei pH= 5,0 mit R18 markierten Epididymosomen (e) in Abhängigkeit von der Zeit (570 sec.).....	54
Abb. 22: <i>In vitro</i> Fusion boviner Nebenhodenspermien (s) bei pH= 7,0 mit R18 markierten Epididymosomen (e) in Abhängigkeit von der Zeit (570 sec.).....	55
Abb. 23: <i>In vitro</i> Fusion boviner Nebenhodenspermien (s) bei pH= 8,0 mit R18 markierten Epididymosomen (e) in Abhängigkeit von der Zeit (570 sec.).....	55
Abb. 24: <i>In vitro</i> Fusion boviner Nebenhodenspermien (s) mit R18 markierten Epididymosomen (e) in Abhängigkeit vom pH Wert nach 10 min	56
Abb. 25: Transfer von Membranbestandteilen von R18 markierten Epididymosomen (e) auf Bullenspermien (s) durch <i>in vitro</i> Fusion in Abhängigkeit vom pH Wert nach 10 min.....	57
Abb. 26: Cholesterolkonzentration boviner Nebenhodenspermien (Caput, Cauda) vor und nach <i>in vitro</i> Fusion mit Caput bzw. Cauda Vesikeln	59
Abb. 27: Phospholipidkonzentration boviner Nebenhodenspermien (Caput, Cauda) vor und nach <i>in vitro</i> Fusion mit Caput bzw. Cauda Vesikeln	60
Abb. 28: Dünnschichtchromatographie extrahierter Lipide von bovinen Nebenhodenspermien vor und nach <i>in vitro</i> Fusion mit bovinen Epididymosomen	61

Abb. 29: Densitometrische Auswertung der über Dünnschichtchromatographie aufgetrennten Phospholipide boviner Nebenhodenspermien (Caput, Cauda).....	61
Abb. 30: Densitometrische Auswertung der über Dünnschichtchromatographie aufgetrennten Phospholipide boviner Caputspermien nach <i>in vitro</i> Fusion mit bovinen Epididymosomen...	63
Abb. 31: Densitometrische Auswertung der über Dünnschichtchromatographie aufgetrennten Phospholipide boviner Caudaspermien nach <i>in vitro</i> Fusion mit bovinen Epididymosomen..	63
Abb. 32: Auftrennung der Membranproteine von Nebenhodenspermien des Caput und Cauda Segmentes im SDS-Gel (7,5%) und Färbung der Proteine mit Coomassie-Blau.	64
Abb. 33: Immunhistologischer Nachweis des Proteintransfers von Biotin- markierten Proteinen der Epididymosomen auf bovine Spermatozoen mittels <i>in vitro</i> Fusion (pH 6,5).....	65
Abb. 34: Westernblot-Analyse von Biotin-markierten Proteinen	66
Abb. 35: Immunzytochemischer Nachweis von PMCA an bovinen Spermien der <i>Caput epididymidis</i>	67
Abb. 36: Immunzytochemischer Nachweis von PMCA an bovinen Spermien der <i>Cauda epididymidis</i>	67
Abb. 37: Immunzytochemischer Nachweis von PMCA4 an bovinen Spermien der <i>Caput epididymidis</i>	68
Abb. 38: Immunzytochemischer Nachweis von PMCA4 an bovinen Spermien der <i>Cauda epididymidis</i>	69
Abb. 39: Immunzytochemischer Nachweis von PMCA4a an bovinen Spermien der <i>Caput epididymidis</i>	70
Abb. 40: Immunzytochemischer Nachweis von PMCA4a an bovinen Spermien der <i>Cauda epididymidis</i>	70
Abb. 41: (A) Mg^{2+} -abhängige und (B) Mg^{2+} -unabhängige Ca^{2+} -ATPase- Aktivität boviner Nebenhodenspermien (Anzahl: 10^6) vor und nach <i>in vitro</i> Fusion mit Epididymosomen	72
Abb. 42: Einfluss von PDC-109 (20 μ g) auf die Mg^{2+} -abhängige Ca^{2+} - ATPase-Aktivität boviner Nebenhodenspermien (10^6) vor und nach <i>in vitro</i> Fusion mit Epididymosomen	74

Abb. 43: Einfluss von PDC-109 (20 µg) auf die Mg ²⁺ -unabhängige Ca ²⁺ -ATPase-Aktivität boviner Nebenhodenspermien (10 ⁶) vor und nach <i>in vitro</i> Fusion mit Epididymosomen	74
Abb. 44: Fluoreszenzmessung am Delta Scan Illuminationssystem (Emission λ= 580, Extinktion λ= 560)	118
Abb. 45: Fluoreszenzmessung am Delta Scan Illuminationssystem (Emission λ= 580, Extinktion λ= 560)	120
Abb. 45: Fluoreszenzmessung am Delta Scan Illuminationssystem (Emission λ= 580, Extinktion λ= 560)	122

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Zusammensetzung der für die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese verwendeten Gellösungen.....	33
Tab. 2: Verwendete Antikörper in der Westernblot-Analyse	35
Tab. 3: Verwendete Antikörper in der Immunfluoreszenz	43
Tab. 4: Lipidzusammensetzung boviner Epididymosomen.....	47
Tab. 5: Densitometrische Auswertung (Scion Image) der durch Dünnschichtchromatographie aufgetrennten Phospholipide boviner Epididymosomen aus dem Caput und dem Cauda Segment	49
Tab. 6: Mg^{2+} -abhängige und -unabhängige Ca^{2+} -ATPase-Aktivität boviner Nebenhodenvesikel	52
Tab. 7: Cholesterol- und Phospholipidkonzentration boviner Nebenhodenspermien vor und nach <i>in vitro</i> Fusion mit Caput bzw. Cauda Vesikeln	58
Tab. 8: Densitometrische Auswertung der über Dünnschichtchromatographie aufgetrennten Phospholipide boviner Nebenhodenspermien durch <i>in vitro</i> Fusion mit bovinen Epididymosomen	61
Tab. 9: Ca^{2+} -ATPase-Aktivität boviner Nebenhodenspermien.....	70
Tab. 10: Der prozentuale Fluoreszenzanstieg nach Zugabe ($t = 30$ sec.) R18 markierter Epididymosomen (e) zu bovinen Nebenhodenspermien (s) bei einem Proteinverhältnis von 2:1 (Spermien: Epididymosomen) in Abhängigkeit von der Zeit ($t = 600$ sec.).....	119
Tab. 11: Der prozentuale Fluoreszenzanstieg nach Zugabe ($t = 30$ sec.) R18 markierter Epididymosomen (e) zu bovinen Nebenhodenspermien (s) bei einem Proteinverhältnis von 2:1 (Spermien: Epididymosomen) in Abhängigkeit von der Zeit ($t = 600$ sec.).....	121
Tab. 12: Der prozentuale Fluoreszenzanstieg nach Zugabe ($t = 30$ sec.) R18 markierter Epididymosomen (e) zu bovinen Nebenhodenspermien (s) bei einem Proteinverhältnis von 2:1	

(Spermien: Epididymosomen) in Abhängigkeit von der Zeit (t= 600 sec.).....	123
--	-----

Abkürzungsverzeichnis

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
Abb.	Abbildung
ACT	Aktin
ADAM	„a disintegrin and metalloproteinase“ - ein Disintegrin und Metalloprotease
ADP	Adenosindiphosphat
AK	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
CaM-BD	Calmodulin-Bindungsstelle
CAH II	Carboanhydrase II
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CLTC	Calthrin
CHOL	Cholesterol
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPG	Diphosphoglycerat
DRM	Detergenzresistente-Membran-Domäne
DS	Detergenz-sensitive-Membran-Domäne
DTE	Dithioerythrit
DTT	Dithiothreitol
ECL	“enhanced chemiluminescence system”
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
GTP	Guanosintriphosphat
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
GPX	Glutathion Peroxidase
h	Stunde
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyI)-ethansulfonsäure
IP3	Inositoltriphosphat
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
K _m	Michaeliskonstante
l	Liter
LDH	Laktatdehydrogenase
Lf	Lactoferrin
LM	Laufmittel
M	Molar
MAGUK	Membran assoziierte Guanylatkinase
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MIF	Makrophagen Migrations-inhibierender Faktor
min	Minute
MFA's	Membranöse Fettsäure
mRNA	„messenger“ Ribonukleinsäure
MVDP	Maus- <i>Vas deferens</i> -Protein
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid

NCX	Na ⁺ /Ca ²⁺ -Austauscher
NGS	“normal goat serum”-Normales Ziegenserum
OF	Oberphase
P25b	bovines Oberflächenprotein bei Spermien
P34H	humanes oberflächenprotein bei Spermien
PA	Phosphatsäure
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PC	Phosphatidylcholin
PDC-109	Major Protein aus der bovinen Bläschendrüse
PDZ	PSD95/Dlg/ZO-1-Interaktionsdomäne
PE	Phosphatidylethanolamin
PGDS	Prostaglandin D2 Synthase
PI	Phosphatidylinositol
PIP	Phosphatidylinositolphosphat
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PL	Phospholipid-sensitive-Region
PMCA	Plasmamembran-Ca ²⁺ -ATPase
PS	Phosphatidylserin
PUFA	mehrfachungesättigte Fettsäure
PVDF	Polyvinylidenfluorid
R18	Octadecylrhodamin B
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SDS	Sodiumdodecylsulfate
Sec	Sekunde
SERCA	Kalziumpumpe des sarcoplasmatischen und endoplasmatischen Retikulums
SM	Sphingomyelin
sOF	Synthetische Oberphase
SPAM1	Spermien Adhäsionsmolekül 1
SRP	Signalerkennungspartikel
sUF	Synthetische Unterphase
Tab.	Tabelle
TCA	Trichloressigsäure
TEKT	Tektin
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TRIS	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol
UF	Unterphase
vOF	vereinigte Oberphase
vUf	vereinigte Unterphase
w/v	weight per volume
ZnCl ₂	Zinkchlorid

1 Einleitung

1.1 Männlicher Reproduktionstrakt

Zu den inneren männlichen Geschlechtsorganen der Säuger gehören die paarigen Hoden (*Testes*), die paarigen Nebenhoden (*Epididymides*) mit dem jeweiligen Samenleiter (*Ductus deferens*) und die akzessorischen Geschlechtsdrüsen (*Gll. vesiculosae*, Prostata, *Gll. bulbourethrales*). Die *Gll. vesiculosae* und die Prostata sind die größten akzessorischen Geschlechtsdrüsen des Bullen (Nickel & Schummer 2003).

1.1.1 Morphologie und Funktion des bovinen Hodens

Der Hoden der Säuger ist ein paariges Organ und befindet sich mit dem Nebenhoden, sowie einem Teil des Samenstranges im Hodensack (*Skrotum*). Der Hoden des Bullen wiegt 250 - 300 g und kann beim selben Tier unterschiedliche Größe erlangen (Nickel & Schummer 2003). Durch die Lagerung der Hoden außerhalb der Abdominalhöhle im Skrotum, kann eine für die Spermatogenese optimale Temperatur (32 °C – 35 °C) garantiert werden.

Das Hodenparenchym wird von einzelnen *Lobuli testis* gebildet, die wiederum mehrere *Tubuli seminiferi contorti* (Samenkanälchen) enthalten. Die *Tubuli seminiferi contorti* des Bullen sind durchschnittlich 50 - 80 cm lang und weisen einen Durchmesser von 200 - 300 µm auf (Santamarina & Reece 1957). Die Wand der *Tubuli seminiferi contorti* besteht aus einer bindegewebigen Schicht mit kontraktionsfähigen Myofibroblasten, einer Basalmembran und dem Keimepithel. Das Keimepithel (*Epithelium spermatogenicum*) setzt sich aus Keimzellen (*Cellulae spermatogenicae*) und Stützzellen (Sertoli-Zellen) zusammen. In den *Tubuli seminiferi contorti* findet die Spermatogenese statt (s. Kap. 1.1.3, S. 5 f).

Die *Tubuli seminiferi contorti* verlaufen über eine Übergangszone, die *Tubuli seminiferi recti*, in das *Rete testis* (Hodennetz). Das *Rete testis* der Rinder ist von einem zweischichtigen Epithel ausgekleidet. Es ist sekretorisch aktiv und vermehrt somit die luminale Samenflüssigkeit. Vom *Rete testis* ziehen mehrere *Ductuli efferentes testis* zur *Caput epididymidis*. Die Spermatozoen verlassen

den Hoden somit über die *Ductuli efferentes testis* in den *Ductus epididymidis* (Nickel & Schummer 2003).

1.1.2 Morphologie und Funktion des Nebenhodens

Der Nebenhoden gliedert sich in *Caput epididymidis*, *Corpus epididymidis* und *Cauda epididymidis* (Abb. 1) (Goyal 1985). Das *Caput epididymidis* (Nebenhodenkopf) liegt dem oberen Pol des Hodens auf und beinhaltet die *Ductuli efferentes testis* (Bulle: Anzahl 12 - 13, Länge 50 - 80 cm), die sich zu den *Lobuli epididymidis* zusammenknäulen (Goyal 1985). Das sich anschließende *Corpus epididymidis* (Nebenhodenkörper) liegt lang gestreckt am hinteren Rand des Hodens. Die *Cauda epididymidis* (Nebenhodenschwanz) geht am unteren Teil des Hodenpols in den *Ductus deferens* über (Abb. 1) (Goyal 1985; Nicander 1958).

Der *Ductus epididymidis* (Nebenhodengang) ist ein mehrere Meter langer Schlauch (Mensch 6 m, Bullen 40 - 50 m) (Nicander 1958), der sich auf wenige Zentimeter zusammengeknäuelte in allen 3 Abschnitten des Nebenhodens befindet. Er macht den Hauptanteil des Nebenhodens aus und ist Ort der funktionellen Reifung und Speicherung der Spermatozoen. Der *Ductus epididymidis* setzt sich in den *Ductus deferens* (Samenleiter) fort, der durch den Leistenkanal über den *Ductus ejaculatorius* in die *Urethra* einmündet. Die Passage der Spermien durch den Nebenhoden dauert bei verschiedenen Säugern trotz unterschiedlicher Länge des *Ductus epididymidis* 10 - 15 Tage. Die Funktion des Nebenhodens und des *Ductus deferens* stehen unter hormoneller Kontrolle (Androgen, 5 α -Dihydrotestosteron) (Vreeburg 1975).

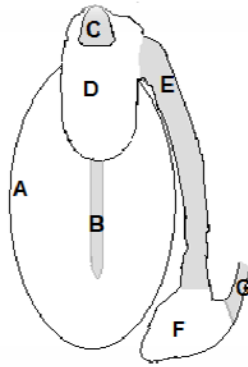


Abb. 1: Schematische Darstellung von Hoden und Nebenhoden. (A) Hoden, (B) Rete testis, (C) Ductuli efferentes, (D) Caput, (E) Corpus und (F) Cauda epididymidis und (G) Ductus deferens (nach Goyal 1985).

Die *Ductuli efferentes* sind abwechselnd von einem einreihig kubischen, einreihig prismatischen oder mehrreihig prismatischen Epithel ausgekleidet (Goyal 1985). Die Hauptzellen des niedrigeren Epithelabschnittes tragen Mikrovilli (Abb. 2A). Dies lässt darauf schließen, dass diese Epithelzellen wahrscheinlich eine sekretorische bzw. resorptive Aufgabe besitzen und somit zur Erhöhung der Spermienkonzentration beitragen. Mehr als 90% des im Hoden gebildeten Sekretes wird im Bereich der *Ductuli efferentes* resorbiert (Crabo & Gustafsson 1964). Es kommt daher zwischen dem *Rete testis* und dem *Caput epididymidis* zu einer achtfachen Konzentrationssteigerung der Spermatozoen im Sekret (Turner, et al. 1984). Die Mikrovilli tragenden Hauptzellen in der Anfangszone des *Ductus efferens* resorbieren bevorzugt Flüssigkeit. Hingegen werden in der Endzone des *Ductus efferens* vermehrt Partikel aus dem Lumen aufgenommen (Abb. 2A) (Goyal 1985). Die höher liegenden Epithelzellen in den *Ductuli efferentes* tragen Kinozilien, die keine resorbierende Funktion besitzen, sondern einen Flüssigkeitsstrom für den Spermientransport verursachen (Goyal 1985).

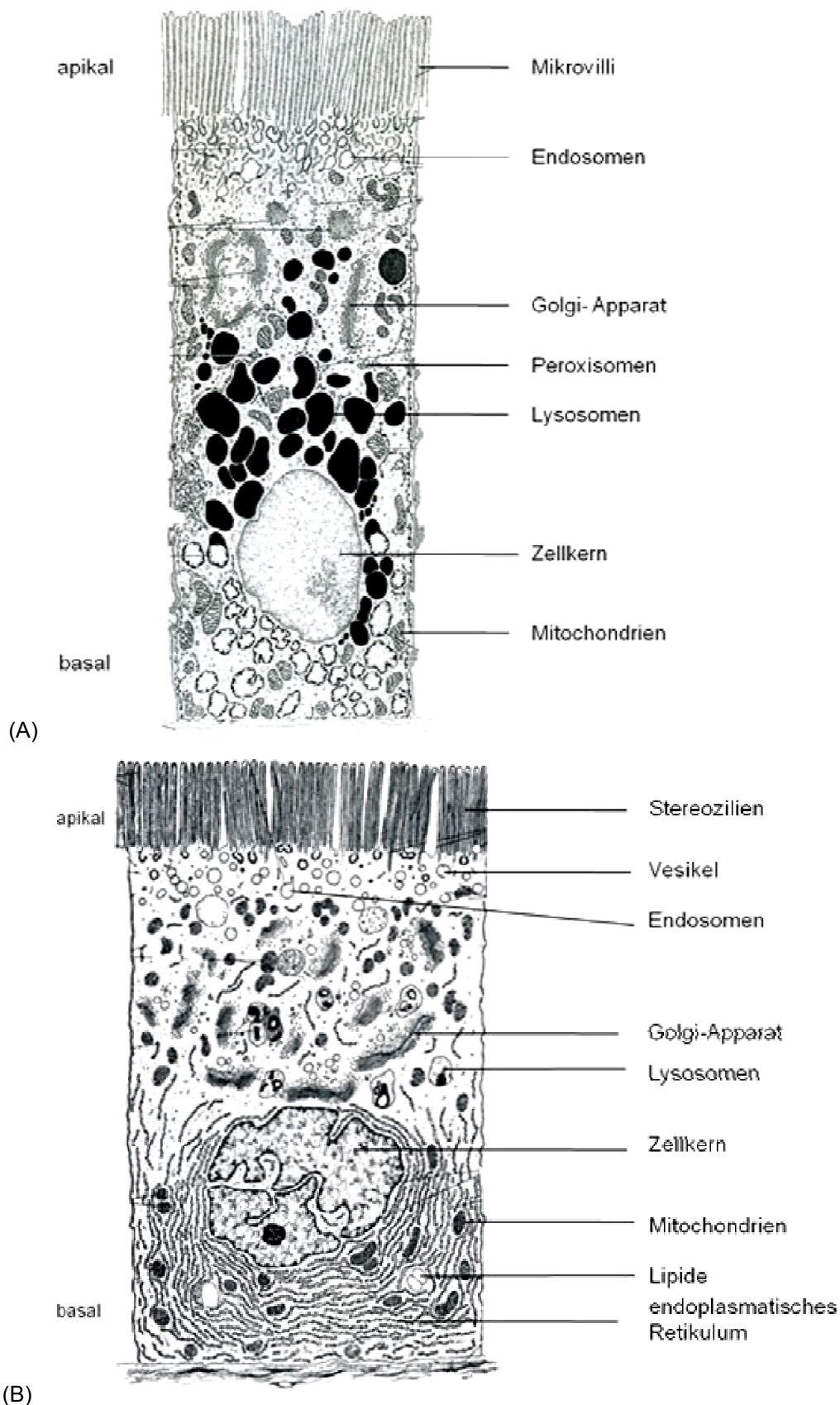


Abb. 2: Schematische Darstellung von epithelialen Zellen der *Ductuli efferentes* und des *Ductus epididymidis*. (A) Mikrovilli tragende epitheliale Zelle aus der Endzone der *Ductuli efferentes*. Zu sehen ist eine erhöhte Ansammlung von dunklen Lysosomen im supranuklearen Raum durch vermehrte Resorption von Partikeln aus dem Lumen. (B) Epitheliale Hauptzelle der *Cauda epididymidis*. (nach Knobil & Neill 1988)

Das Epithel des *Ductus epididymidis* besteht vorwiegend aus Haupt- und Basalzellen, ist zweireihig hochprismatisch und wird von proximal nach distal niedriger (Goyal 1985). Außen am Epithel liegt glatte Muskulatur an, die im distalen Abschnitt des *Ductus epididymidis* an Dicke zunimmt (Goyal 1985). Die Hauptzellen des *Ductus epididymidis* sind kleiner als die der *Ductuli efferentes*. Sie besitzen eine breitere Oberfläche zur Kommunikation mit dem Nebenhodenlumensekret. An der freien Oberfläche werden die Hauptzellen von büschelartigen Stereozilien bedeckt, die an resorptiven Vorgängen beteiligt sind (Abb. 2B) (Goyal 1985), so dass im Bereich der *Cauda epididymidis* es zu einer 20fachen Konzentrierung der Spermatozoen kommt (Turner et al. 1984). Weiterhin sind die Hauptzellen durch sekretorische Prozesse an der Schaffung eines leicht sauren Milieus im Nebenhoden beteiligt (*Caput epididymidis*: pH 6,48; *Cauda epididymidis*: pH 6,85), wodurch die Spermatozoen in eine Säurestarre versetzt werden (Levine & Marsh 1971).

1.1.3 Spermatogenese

Im *Epithelium spermatogenicum* der *Tubuli seminiferi contorti* des Hodens erfolgt die Bildung der männlichen Keimzellen (Spermatogenese). Die Keimzellen differenzieren sich im *Epithelium spermatogenicum* aus embryonal eingewanderten Primordialkeimzellen und stehen während der Spermatogenese in engen Kontakt mit den Stützzellen. Die Anzahl der verschiedenen Teilungsschritte und die Dauer der gesamten Spermatogenese unterscheidet sich bei den verschiedenen Tierspezies (Bulle ca. 52 Tage) (Liebich 2003).

Es werden zwei Stadien der Spermatogenese unterschieden:

1. Spermatozytogenese
2. Spermiogenese

Während der Spermatozytogenese erfolgt die Teilung der Spermatogonien in 2 Tochterzellen, wobei eine Tochterzelle als Stammzelle verbleibt. Die andere Tochterzelle unterliegt weiteren mitotischen Teilungen. Die Teilung am Ende der Telophase erfolgt nie ganz vollständig, so dass immer eine Interzellularbrücke zwischen den Spermatogonien verbleibt. Dies dient dem interzellularen Stoffaustausch und der Koordination späterer Teilungsschritte.

Erst gegen Ende der Spermiogenese verlieren die Keimzellen die Interzellularbrücken (Liebich 2003).

Aus den Spermatogonien bilden sich die primären Spermatozyten. Aus diesen gehen durch die 1. Reifeteilung (Reduktionsteilung) sekundäre Spermatozyten hervor, die sich durch die 2. Reifeteilung (Äquationsteilung) duplizieren und Spermatiden bilden. Der Chromosomensatz der primären Spermatozyten ist tierartspezifisch (Rind: 60 Chromosomen). Am Ende der Spermatozytogenese liegt in jeder Spermatide ein haploider Chromosomensatz und ein reduzierter DNA-Gehalt ($1n$) vor (Liebich 2003).

Während der Spermiogenese erfolgen Zelldifferenzierungen der Spermatiden zu Spermatozoen, aber keine weiteren Teilungen. Die Spermiogenese erfolgt unter ständigem Stoffaustausch zwischen Keimzelle und anliegenden Sertoli-Zellen. An den Umgestaltungsprozessen und Differenzierungen der Spermatiden zum Spermium sind hauptsächlich der Nukleus, der Golgi-Apparat und das Zentriol beteiligt. Am Ende der Spermiogenese steht das morphologisch ausdifferenzierte, jedoch noch nicht befruchtungsfähige Spermium. Die Reifung des Spermiums erfolgt während der Passage durch den Nebenhoden.

1.1.4 Morphologie des Spermiums

Das Spermium besteht aus einem Spermienkopf und einem Spermienchwanz (Abb. 3). Der Spermienchwanz lässt sich in ein Hals-, Mittel-, Haupt- und Endstück gliedern. Die Form und Größe eines Spermiums sind tierspezifisch.

Der Spermienkopf beinhaltet im Wesentlichen den Kern. Über dem Kern liegt kappenartig das Akrosom (Abb. 3). Im distalen Bereich des Spermienkopfes befinden sich das Äquatorialesegment und die postakrosomale Region (Abb. 3). Das Akrosom beinhaltet hydrolytische Enzyme, Hyaluronidase, Neuraminidase und Akrosin. Diese sind für die Penetration des Spermiums durch die *Corona radiata* und die *Zona pellucida* der Eizelle wichtig (Liebich 2003).

Das Halsstück (*Pars conjugens*) beinhaltet die gelenkige Verbindung zwischen dem Spermienkopf und dem Spermischwanz. Zentral gelegen im Spermienhals beginnt das Axonema (Abb. 3) (Liebich 2003).

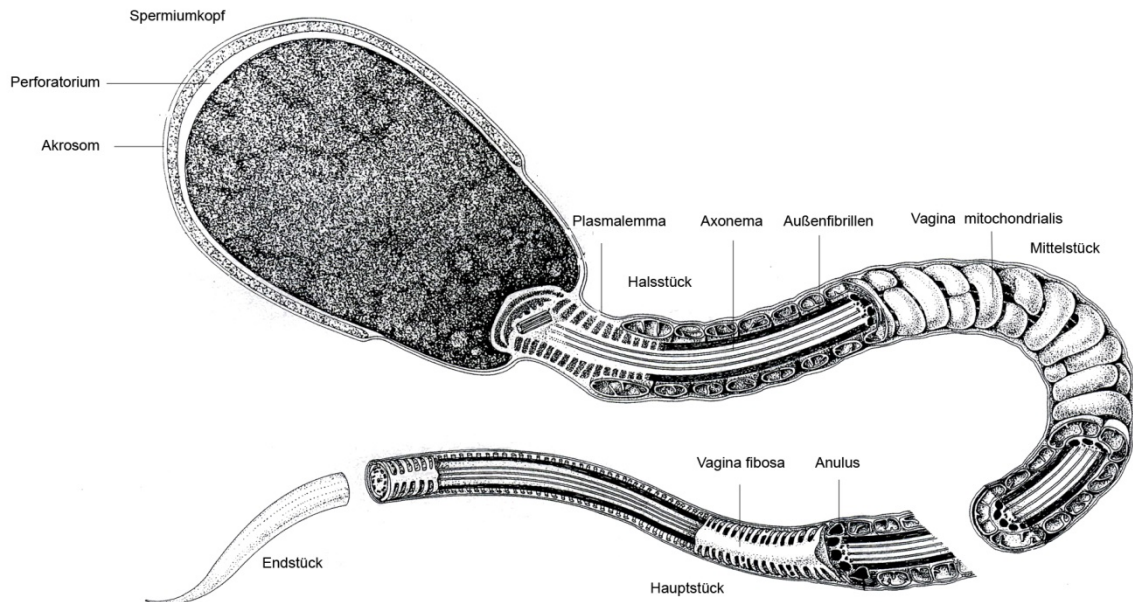


Abb. 3: Schematischer Aufbau eines Bullenspermiums. (nach Liebich 2003)

Das Mittelstück (*Pars intermedia*) wird zentral vom Axonema durchzogen und setzt sich aus dem typischen 9x2+2-Mikrotubulimuster zusammen. Den neun Außentubuli des Axonema liegen die *Fibrae densae externae* (Außenfibrillen) an. Auf den Außenfibrillen liegt die *Vagina mitochondrialis*. Die Mitochondrien der *Vagina mitochondrialis* sind spiralförmig angeordnet (Abb. 3). Distal des Spermiums wird das Übertreten der Mitochondrien in das Hauptstück durch den Anulus (Schlussring) verhindert (Liebich 2003).

Im Hauptstück (*Pars principalis*) verläuft weiterhin zentral das Axonema. Der Mantel der Außenfibrillen nimmt nach distal allmählich ab (Abb. 3). Unter dem Plasmalemma befindet sich eine *Vagina fibrosa* (Ringfaserscheide). Im Endstück (*Pars terminalis*) enden die vom Plasmalemma umgebenen Mikrotubuli frei (Abb. 3) (Liebich 2003).

1.1.5 Reifungsprozess der Spermien im Nebenhoden

Die Entwicklung der männlichen Gameten ist das Resultat intensiver zellulärer Differenzierung von unpolarierten Spermatiden zu polarisierten und voll

beweglichen Spermien. Im Hoden und im proximalen Anteil des Nebenhodens sind die Spermien weder motil noch fertil (Lakoski, et al. 1988; Orgebin-Crist 1967). Erst im distalen Nebenhodenabschnitt erlangen die Spermien ihre Motilität, die Fähigkeit zur Zona Pellucida-Bindung und zur Akrosomenreaktion (Lakoski et al. 1988; Saling 1982).

Die Sekretionsfähigkeit des Nebenhodenepithels ist eine wichtige Voraussetzung für die post-testikuläre physiologische und funktionelle Reifung der Spermien. Im intraluminalen Sekret des Nebenhodens kommen verschiedenste sekretierte Proteine vor, die mit der Oberfläche der Spermien interagieren können. Hunderte von Proteinen wurden bereits im Sekret aus unterschiedlichen Teilen des Nebenhodens charakterisiert (Hengst: 117 Proteine (Fouchecourt, et al. 2000), Wildschwein: 125 - 146 Proteine (Syntin et al. 1996; Syntin et al. 1999), Ratte: 87 Proteine (Turner, et al. 2000)). Darunter sind Albumin, Laktoferrin (Lf), Clusterin, Cholesterol Transferprotein, Glutathion Peroxidase (GPX), Prostaglandin D2 Synthase (PGDS), Hexosaminidase und Procathepsin D die meisten sekretierten Proteine des Nebenhodens, wobei die Sekretionsmenge speziesspezifisch ist (Fouchecourt et al. 2000; Syntin et al. 1996; Turner et al. 2000). Die Sekretion der meisten Proteine im Nebenhoden erfolgt unter Androgener Kontrolle oder unter lokalen Einflüssen (Holland et al. 1992; Syntin et al. 1999).

Einige für die Spermienreifung essentielle Proteine gehören zu den Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker Proteinen (CD52, CD59, P34H, P26h, P25b) (Frenette & Sullivan 2001; Fukushima, et al. 2005; Kirchhoff 1996; Kirchhoff & Hale 1996; Legare, et al. 1999a, 1999b; Yeung, et al. 1997), die in die Spermienmembran eingebaut werden. Der Einbau von GPI-Anker Proteinen in die Membran ist noch nicht ganz verstanden. Es wird postuliert, dass entweder eine direkte Übertragung über die apikale Membran der epididymalen Zelle erfolgt oder über apokrin sekretierte Vesikel des Nebenhodenepithels (Epididymosomen) (siehe Kap. 1.2.2 S. 13) (Frenette & Sullivan 2001; Kirchhoff & Hale 1996).

Bei der Reifung der Spermien im Nebenhoden wird nicht nur die Proteinzusammensetzung der Spermienmembran modifiziert, sondern auch die

Lipidstruktur der Membran verändert (Evans & Setchell 1979; Nikolopoulou, et al. 1985). Diese Modifikationen sind von Spezies zu Spezies verschieden. In den meisten der untersuchten Tierarten (Wildschwein, Schaf, Ziege, Maus, Ratte) sind Phosphatidylethanolamin (PE) und Phosphatidylcholin (PC) die häufigsten Phospholipide in der Plasmamembran von Caputpermien. Dies kann sich im Verlauf des Nebenhodens wandeln (Evans & Setchell 1979; Hall et al. 1991; Nikolopoulou et al. 1985; Parks & Hammerstedt 1985; Poulos, et al. 1973; Rana, et al. 1991; Rejraji, et al. 2006). Weiterhin erfolgt während der Spermienreifung im Nebenhoden eine Veränderung der Gesamt-Phospholipid-Konzentration und der Cholesterolkonzentration, so dass sich das Cholesterol/Phospholipid (CHOL/P)-Verhältnis ändert (Hall et al. 1991; Nikolopoulou et al. 1985; Parks & Hammerstedt 1985; Poulos et al. 1973; Rana et al. 1991; Rejraji et al. 2006). Im Verlauf des Nebenhodens modifiziert sich ebenfalls in der Spermienmembran die Komposition der membranösen Fettsäuren (MFA's) und somit auch das Verhältnis von saturierten zu ungesättigten Fettsäuren (Nikolopoulou et al. 1985; Rejraji et al. 2006). Die in der Nebenhodenspermienmembran am häufigsten nachgewiesenen gesättigten Fettsäuren von Bulle, Maus, Ratte und Wildschwein sind Stearinsäure (18:0) und Palmitinsäure (16:0). Die ungesättigte Fettsäure Docosapentaensäure (22:5) kommt vermehrt bei Nebenhodenspermien von Maus, Wildschwein und Ratte vor (Hall et al. 1991; Nikolopoulou et al. 1985; Rejraji et al. 2006). Hingegen in bovinen Nebenhodenspermien ließ sich vermehrt Docosahexaensäure (22:6) nachweisen (Poulos et al 1973).

Zusätzlich zur Umgestaltung der Lipid- und Proteinkomposition kommt es zu biochemischen Veränderungen in der Spermienmembran entlang des Nebenhodens. In bovinen Spermien konnte unter anderem ein Anstieg der intrazellulären c-AMP Konzentration bei gleicher Menge c-AMP-abhängiger Proteinkinase Aktivität im Verlauf des Nebenhodentraktes nachgewiesen werden. Dies wird im Zusammenhang mit der Entwicklung kapazitationsabhängiger Funktionen der Spermien (verstärkte Motilität, Metabolismus) interpretiert (Hoskins et al. 1975).

1.2 Sekretionsmechanismen im männlichen Reproduktionstrakt

Die meisten sekretorischen Proteine werden über den klassischen Weg der merokrinen Sekretion exportiert. Diese Proteine erhalten im Verlauf der Translation ihrer mRNA am Ribosom ein hydrophobes N-terminales Signalpeptid. Das entstandene Peptid kann somit an einen Protein-Komplex, den Signalerkennungspartikel (SRP) binden. Das gebundene SRP steuert das Ribosom mit dem unvollständigen Polypeptid an den SRP-Rezeptor auf der zytosolischen Seite des endoplasmatischen Retikulums (ER). Ein Translokationskomplex transportiert nun unter ATP-Verbrauch das Polypeptid in das Lumen des ER's. An die meisten merokrinen Proteine werden im ER ko-translational Oligosaccharide N-glykosidisch gekoppelt. Im Golgi-Apparat findet dann eine weitere Prozessierung des Proteins statt (Bsp. Modifizierung der N-glykosidischen Zuckerreste, O-Glykosylierung, posttranslationale Proteolyse). Danach wird das Protein in membranbegrenzte Sekretvesikel verpackt und über Exozytose nach außen geschleust. Während der Exozytose kommt es zur Fusion zwischen der Sekretvesikelmembran und der Plasmamembran. Es bildet sich eine Ω -Figur mit einer Öffnung, wodurch der Inhalt in den extrazellulären Raum abgegeben wird (Abb. 4A) (Flickinger 1981; Palade 1975).

Untersuchungen an der Koagulationsdrüse und der dorsalen Prostata der Ratte haben gezeigt, dass die Synthese zweier Proteine (Transglutaminase, 115 K-Protein) simultan abläuft (Bartlett, et al. 1984), wobei sich der Sekretionsmechanismus unterscheidet (Groos, et al. 1999; Seitz, et al. 1990). Im männlichen Reproduktionstrakt sind daher neben der merokrinen Sekretion auch alternative Exportmechanismen, wie zum Beispiel die apokrine Sekretion und Diazytose vorzufinden.

1.2.1 Apokrine Sekretion der männlichen akzessorischen Geschlechtsdrüsen

Die apokrine Sekretion (Abb. 4B), die erstmals durch Schiefferdecker beschrieben wurde (Schiefferdecker 1922), kommt vorwiegend in Drüsen und Geweben mit reproduktiver Bedeutung vor. Die apokrine Sekretion wurde

bisher im *Ductus epididymidis*, in der Rattenkoagulationsdrüse (*Lobus cranialis* der Prostata), in der dorsalen Prostata (*Lobus dorsalis* der Prostata) der Ratte, sowie im *Vas deferens* bei unterschiedlichen Spezies dokumentiert (Agrawal & Vanha-Perttula 1988; Aumüller & Adler 1979; Bartlett et al. 1984; Eickhoff et al. 2006; Eickhoff et al. 2001; Fornes, et al. 1991; Groos et al. 1999; Hermo & Jacks 2002; Manin, et al. 1995; Rejraji et al. 2006; Seitz et al. 1990; Wilhelm et al. 1998). Neben Drüsen mit reproduktiver Bedeutung findet die apokrine Sekretion auch in der laktierenden *Glandula mammaria*, der *Gl. sudoriferae apocrinae* und in der *Gl. ciliares* statt (Kurosumi, et al. 1984; Schaumburg-Lever & Lever 1975).

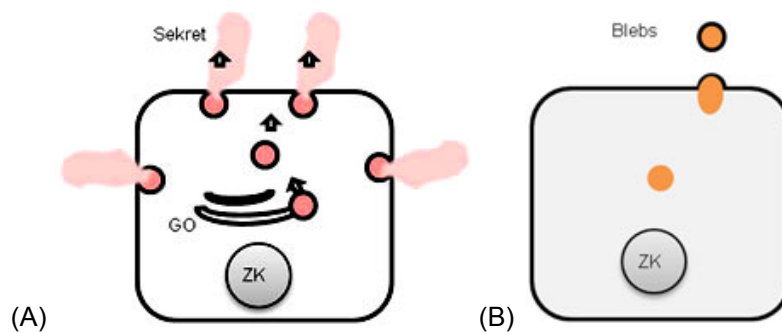


Abb. 4: Sekretionsmechanismen im männlichen Reproduktionstrakt. (A) Exozytose, (B) apokrine Sekretion; Go- Golgi-Apparat, ZK- Zellkern

Während der apokrinen Sekretion erfolgt die Abgabe von Sekret durch Abschnürung von zytoplasmahaltigen Blasen (Blebs, Aposomen) am apikalen Zellpol. Im anfänglichen Stadium der apokrinen Sekretion zeigt sich eine starke Reorganisation des Zytoskeletts am apikalen Zellpol (Rejraji et al. 2006). Die genaue Entstehung der Aposomen ist aber noch nicht geklärt. Bisher wurde gezeigt, dass apokrin sekretierte Vesikel durch Brüche an Stereozilien der Epithelzellen im Nebenhoden der Ratte entstehen können (Fornes & De Rosas 1991), als auch an Mikrovilli ähnlichen Strukturen in der dorsalen Prostata (Aumüller & Adler 1979).

Bekannt ist, dass die Blebs anfänglich die Verbindung zur apikalen Plasmamembran über einen Stiel behalten, bevor sie sich abschnüren und ins Lumen abgegeben werden (Fornes & De Rosas 1991). Durch die Abschnürung entsteht eine Ruptur an beiden Seiten der Aposomen-Zytoskelett-Verbindung

(Rejraji et al. 2006). Ob die Vesikel im Lumen erhalten bleiben (Eickhoff et al. 2006) oder ihren Inhalt ins Lumen durch Auflösung der Membran entlassen (Sullivan et al. 2007) ist bisher nicht geklärt.

Die Formation der apikalen Aposomen und die Synthese und Sekretion apokriner Proteine ist ein Androgen-abhängiger Prozess (Bartlett et al. 1984; Holterhus, et al. 1993; Steinhoff, et al. 1994). Untersuchungen an der Koagulationsdrüse der Ratte belegen, dass es durch Androgenentzug zu einem starken Verlust der Aposomen kommt und damit einhergehend zu einem Verlust von apokrin sekretierten Proteinen (Transglutaminase, PMCA1b) (Holterhus et al. 1993; Post, et al. 2008; Steinhoff et al. 1994). Eine Estrogenbehandlung führt nur teilweise zur Hemmung der apokrinen Sekretion, aber die Aposomen sind in einer irregulären Form vorzufinden (Holterhus et al. 1993; Steinhoff et al. 1994).

Im Gegensatz zur merokrinen Sekretion, sind während der apokrinen Sekretion weder das endoplasmatische Retikulum (ER), der Golgi-Apparat oder die Golgi-Vesikel beteiligt. Apokrin sekretierte Proteine werden ohne hydrophobes N-terminales Signalpeptid im Zytoplasma an Polyribosomen synthetisiert und dann direkt in die apikalen Ausstülpungen transferiert. Dieser alternative Sekretionsweg wurde als erstes für die Transglutaminase aus der Koagulationsdrüse und der dorsalen Prostata der Ratte beschrieben (Seitz et al. 1990; Steinhoff et al. 1994). Weiterhin wurde die Carboanhydrase II (CAH II) aus der Koagulationsdrüse der Ratte als ein apokrin sekretiertes Protein identifiziert (Wilhelm, et al. 1998). Außerdem wird für das MVDP („Mause-Vas deferens-Protein“) im murinen *Vas Deferens* (Manin et al. 1995) und für MIF (Makrophagen Migrations-inhibierender Faktor) im Nebenhoden (Eickhoff et al. 2001) ein apokriner Sekretionsmechanismus postuliert. Alle diese apokrin sezernierten Proteine sind über N-terminale Acetylierung blockiert (Ho, et al. 1992; Manin et al. 1995; Wilhelm et al. 1998). Wie die CAH II und die Transglutaminase ist MIF ausschließlich im Zytosol und in den Aposomen lokalisiert (Eickhoff et al. 2001; Seitz et al. 1990; Wilhelm et al. 1998). Frühere Untersuchungen an der Rattenkoagulationsdrüse bewiesen am Beispiel der Plasmamembran- Ca^{2+} -ATPase (PMCA), dass Membranproteine der apikalen Plasmamembran der Epithelzellen auch in der Membran der Aposomen

vorkommen (Post et al. 2002; Post et al. 2008) und daher auch während des apokrinen Sekretionsprozesses ins Lumen exportiert werden.

1.2.2 Epididymosomen – Apokrin sekretierte Vesikel des Nebenhodens

Epididymosomen sind isolierte, über Ultrazentrifugation gewonnene apokrin sekretierte Vesikel des Nebenhodensekretes (Rejraji et al. 2006). Ihre Herkunft ist bisher nicht genau geklärt. Einerseits wird postuliert, dass die Epididymosomen kleine Vesikel innerhalb der Aposomen (apikale Ausstülpung) sind und durch Fragmentierung der Aposomen ins Nebenhodensekret entlassen werden (Sullivan et al. 2007). Auf der anderen Seite gehen Eickhoff et al. 2001 davon aus, dass die über Ultrazentrifugation gewonnenen Nebenhodenvesikel den Aposomen entsprechen (Eickhoff et al. 2001), also die Epididymosomen darstellen, auch wenn der Begriff „Epididymosomen“ nicht explizit genannt wird.

Epididymosomen sind von einer Membran (Lipiddoppelschicht) umgeben, haben eine annähernd kugelige Gestalt, sind heterogen in ihrer Größe (50 nm – 800 nm) und ihren Bestandteilen (Rejraji et al. 2006). Murine Epididymosomen beinhalten elektronendichtes Material und keine Organellen (Rejraji et al. 2006). Sie sind gegen Kochen, Einfrieren, Auftauen, Ultraschallbehandlung und die Behandlung mit nichtionischen Detergenzien resistent (Frenette & Sullivan 2001).

Die genaue Lipidzusammensetzung der Epididymosomen wurde bis zum Beginn dieser Arbeit nur bei der Maus untersucht. Die murinen Epididymosomen sind reich an Sphingomyelin (SM), Phosphatidylcholin (PC) und Phosphatidylethanolamin (PE). Das Verhältnis von Cholesterol zu Phospholipiden in den Epididymosomen nimmt entlang des Nebenhodenganges stark zu, während die Phospholipidkonzentration und die Cholesterolkonzentration abnimmt (Rejraji et al. 2006). In murinen Epididymosomen wurde über eine Phospholipid-Fettsäureanalyse die mengenmäßig am meisten vorkommenden Fettsäuren (Palmitinsäure (16:0), Stearinsäure (18:0), Arachidonsäure (20:4)) dokumentiert. Von Caput- zu Cauda Epididymosomen kommt es insgesamt zu einer Reduktion der

unsaturierten Fettsäuren. Einhergehend mit der Lipidkomposition und dem erhöhten Verhältnis zwischen Cholesterol zu Phospholipiden ist die Membran von Cauda Epididymosomen starrer als die der Caput Epididymosomen (Rejraji et al. 2006).

Durch proteomische Analysen konnten bisher 146 unterschiedliche Proteine in humanen Epididymosomen identifiziert werden (Thimon, et al. 2008). Dabei wurden Moesin, Ezrin und Radixin verkettet mit Aktin (ACTA1, ACTB), sowie Tektin (TEKT3) nachgewiesen. Weiterhin wurde Clathrin (CLTC) und unterschiedliche Arten von Annexinen in den Epididymosomen beschrieben. Diese Proteinkomposition soll zur Stabilisierung der intraluminalen membranösen Vesikel beitragen (Thimon et al. 2008). Weitere Epididymosomen assoziierte Proteine sind die Zona-Pellucida-Bindungsproteine (P26h, P25b) (Frenette & Sullivan 2001; Legare et al. 1999a), der Makrophagen Migrations-inhibierende Faktor (MIF) (Eickhoff et al. 2006; Eickhoff, et al. 2001; Frenette, et al. 2005), Enzyme des Polyol Signalweges (Frenette, et al. 2006b), Typ 5 Glutathion Peroxidase (GPX 5) (Rejraji, et al. 2002) und SPAM1 (Spermien Adhäsionsmolekül 1) (Deng, et al. 2000).

Membranöse Vesikel im Lumen des Nebenhodens die mit der Oberfläche von Hamsterspermien interagieren, wurden erstmals mittels elektronenmikroskopischer Untersuchungen von Yanagimachi et al. beschrieben (Yanagimachi, et al. 1985). Darauf folgende Studien belegten, dass Epididymosomen fusogene Eigenschaften besitzen, die den Austausch von Proteinen mit Spermatozoen ermöglichen (Frenette, et al. 2006a). *In vitro* wurde bisher die Übertragung von P25b (bei Bulle) und ADAM7 (bei Maus) mittels apokrin sekretierter Nebenhodenvesikel auf Spermatozoen nachgewiesen (Frenette & Sullivan 2001; Oh, et al. 2009).

1.2.3 Prostatasomen der humanen Prostata

Prostatasomen sind in Speichervesikeln vorhandene granuläre Vesikel der Prostataepithelzellen. Sie werden vermutlich mittels Exozytose oder Diazytose in das Drüsenlumen abgegeben (Brody, et al. 1983).

Isolierte Prostatasomen besitzen im Durchschnitt eine Größe von 150 – 200 nm und sind von einer mehrschichtigen Plasmamembran umgeben (Arienti et al. 1997a; Brody et al. 1983). In ihrer Lipidzusammensetzung dominieren Cholesterol und Sphingomyelin. Desweiteren haben Prostatasomen ein sehr hohes Cholesterol/Phospholipid (CHOL/P)-Verhältnis (Arvidson, et al. 1989). Proteomische Analysen an Prostatasomen listen bis zu 139 Proteine auf. Darunter sind Enzyme, Transporterproteine, GTP-Proteine, Chaperone und Signaltransduktionsproteine (Utleg, et al. 2003). Dies spiegelt die vielfältige Funktion der Prostatasomen wieder.

Arienti et al. (1997a) wies *in vitro* die Fusion von Prostatasomen mit Spermien in Abhängigkeit vom pH-Wert nach (Arienti et al. 1997a). Daher wurde postuliert, dass Prostatasomen die Spermien über diese Fusionsereignisse vor dem sauren vaginalen Milieu schützen können (Arienti et al. 1999; Arienti et al. 1997a) und die Motilität der Spermien unter verschiedensten Bedingungen fördern (Arienti et al. 1999; Fabiani et al. 1994). Untersuchungen der ejakulierten Spermien *nach in vitro* Fusion mit Prostatasomen wiesen einen Übertragung von Lipiden nach, sowie eine Abnahme der Fluidität der Spermienmembran (Arienti et al. 1998; Carlini et al. 1997), was als mögliche Verzögerung einer frühzeitigen Akrosomenreaktion interpretiert wird (Arienti et al. 1998). Außerdem wurde nachgewiesen, dass die Aminopeptidase N/CD13 und die Dipeptidylpeptidase IV/CD26 von der Prostatasomenmembran auf ejakulierte Spermien mittels *in vitro* Fusion übertragen werden (Arienti, et al. 1997b; Arienti, et al. 1997c; Arienti, et al. 1997d).

1.3 Die Plasmamembran- Ca^{2+} -ATPase (PMCA)

1.3.1 Kalzium - ein Regulator für zelluläre Prozesse

Kalzium ist ein allgemeiner Regulator für zelluläre Prozesse von der Befruchtung bis hin zum Zelltod. Für das Überleben einer Zelle ist es wichtig, dass ein hoher intrazellulärer Kalziumspiegel nicht von Dauer ist. Würde dies der Fall sein, käme es u.a. zu einer mitochondrialen Überlastung, Aktivierung von Proteasen und DNA-Fragmentierungsenzymen, was als Folge zum Zelltod führt. Die Aufrechterhaltung einer niedrigen zytosolischen Kalziumkonzentration

wird hauptsächlich durch transmembrane Transportsysteme ermöglicht (Carafoli 1987).

In der Zelle gibt es drei große Systeme (Plasmamembran- Ca^{2+} -ATPase, $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher, Ca^{2+} -ATPase des sarko- und endoplasmatischen Retikulums („Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase“; SERCA)) die für die Langzeitregulation der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration verantwortlich sind. Sie sind energieverbrauchend und gehören zur Familie der P-Typ ATPasen. Alle P-Typ ATPasen zeigen den gleichen grundlegenden Reaktionsmechanismus des Ionentransports. Dabei treibt die durch ATP-Hydrolyse freiwerdende Energie die Transportmechanismen an, die mit einer Konformationsänderung des Enzyms sowie der Phosphorylierung eines Aspartatrestes einhergehen (Bastide et al. 1973; Deganie & Boyer 1973; Inesi & Kirtley 1992; Wuytack & Raeymaekers 1992).

Der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (NCX) gehört zu den Antiporter-Systemen, der den Kalzium-Ausstrom an einen Natrium-Einstrom koppelt (Philipson & Nicoll 1992). Der NCX ist vermehrt im Sarkolemma des Herzens (Reuter & Seitz 1968) und in der axonalen Plasmamembran (Baker, et al. 1967) nachzuweisen.

SERCA wurde 1961 von Hasselbach et al. entdeckt (Hasselbach & Makinose 1961) und später aus der sarkoendoplasmatischen Retikulum Membran des Skelettmuskels isoliert (MacLennan 1970). SERCA Pumpen spielen bei der Kontrolle der Herzmuskel Relaxation eine wichtige Funktion (Luo, et al. 1994). SERCA bindet Kalzium mit hoher Affinität auf der zytosolischen Seite, was zu einer Konformationsänderung des Transmembranproteins führt ($\text{E1} \rightarrow \text{E2}$). Die E1-Konformation zeigt eine hohe Affinität zu Kalzium. In der E2-Konformation besteht eine niedrigere Affinität zu Kalzium, so dass im Lumen des sarkoendoplasmatischen Retikulums Kalzium abgegeben werden kann. SERCA kann zwei Kalziummoleküle pro ATP Hydrolyse transportieren (Vilsen 1995).

In den nächsten Kapiteln wird die Plasmamembran- Ca^{2+} -ATPase (PMCA) ausführlicher beschrieben, da sie in der vorliegenden Arbeit eine größere Rolle spielt.

1.3.2 Allgemeine Funktion der PMCA

Die Plasmamembran- Ca^{2+} -ATPase wurde erstmals 1979 aus humanen roten Blutzellen isoliert (Niggli, et al. 1979). Sie besitzt 10 Transmembransegmente, wobei der Hauptanteil, sowie die NH_2 - und COOH -terminale Region auf der zytosolischen Seite lokalisiert sind (Abb. 5). Der zytosolische Teil der PMCA wird in drei große Regionen untergliedert. Die erste Region ist die „Transduktionsregion“. Sie besteht aus der intrazellulären Schleife zwischen dem zweiten und dritten Transmembransegment. Die „Transduktionsregion“ spielt bei der Konformationsänderung der PMCA während des Transportzyklus eine wichtige Rolle (Enyedi, et al. 1989). Sie beinhaltet außerdem eine Lysinreiche Phospholipid-sensitive Region (PL-Region) (Adamo, et al. 2003; Zvaritch, et al. 1990), sowie eine amphipatische alpha-helikale Struktur (G-Protein-Bindungsstelle), die eine inter- und intramolekulare Protein-Protein-Interaktion ermöglicht (Lotersztajn, et al. 1992) (Abb. 5).

Eine weitere große Einheit befindet sich zwischen dem Transmembransegment vier und fünf. Diese große katalytische Region beinhaltet ein Aspartat, welches während der ATP-Hydrolyse ein Acyl-Phosphat-Intermediat formen kann, sowie die ATP-Bindungsstelle. Nach dem zehnten Transmembransegment befindet sich die C-terminale Region mit einer Calmodulin-Bindungsstelle (CaM-BD) (James, et al. 1988; James, et al. 1987) (Abb. 5). PMCA b-Spleißformen können außerdem über ihre PDZ-Interaktionsdomäne (PDZ-BD) (Abb. 5) mit Proteinen der MAGUK (Membran assoziierte Guanylat-Kinase) Familie interagieren (DeMarco & Strehler 2001; Kim, et al. 1998; Schuh et al. 2003).

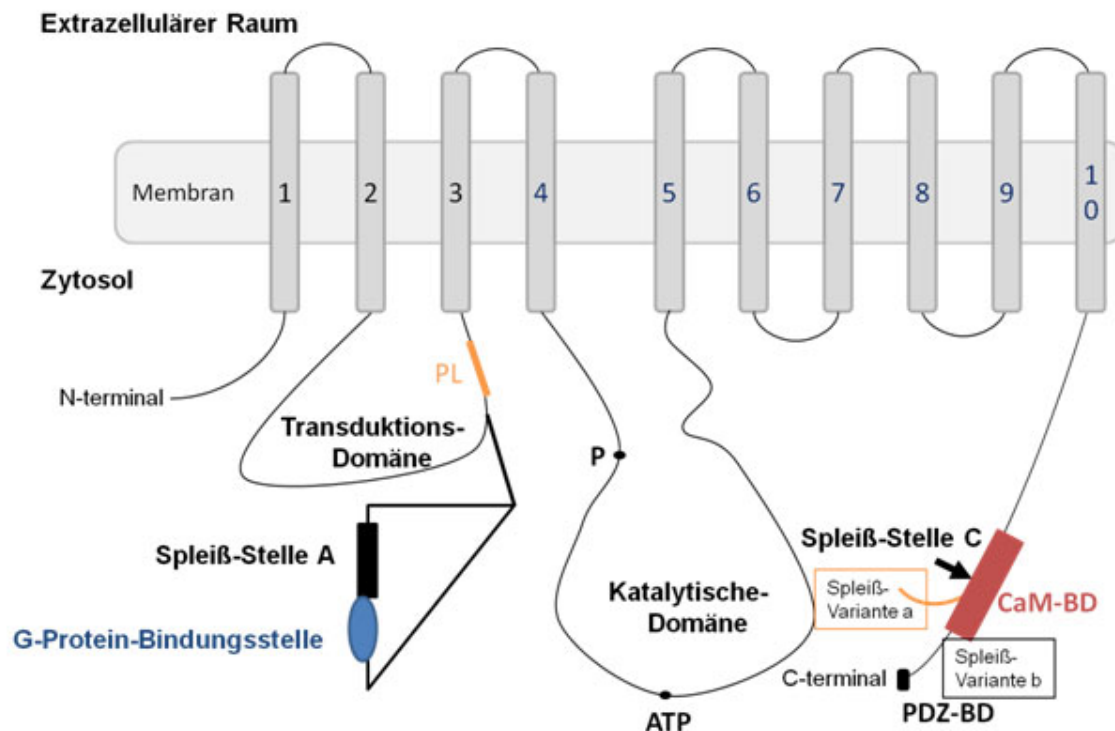


Abb. 5: Schema einer Plasmamembran- Ca^{2+} -Pumpe (PMCA). PL – putative Phospholipid-Bindungsstelle; P – Phosphorylierungsstelle (Aspartat), ATP - ATP-Bindungsstelle, CaM-BD – Calmodulin Bindungsstelle; PDZ-BD – PDZ-Interaktionsdomäne (modifiziert nach Strehler & Zacharias 2001)

Der Reaktionszyklus der PMCA gleicht dem der SERCA, außer dass die PMCA nur ein Kalzium Molekül pro ATP-Hydrolyse transportieren kann (Niggli, et al. 1982). PMCA gehört wie SERCA zu den E1-E2-Transport-ATPasen, daher existieren zu verschiedenen Reaktionszeitpunkten auch hier zwei unterschiedliche Konformationstypen (E1 und E2). In der E1 Konformation liegt die Ca^{2+} -Bindungsstelle frei auf der zytosolischen Seite. Durch Phosphorylierung des Aspartates innerhalb der katalytischen Domäne kommt es zu einer Konformationsänderung (E2). Nun kann das Ca^{2+} -Molekül auf die extrazelluläre Seite transportiert werden. Nachdem Ca^{2+} an der Außenseite abgegeben wurde, spaltet sich das E2-P Intermediat und es liegt wieder die anfängliche E1 Konformation vor (Stokes, et al. 1999) (Abb. 6).

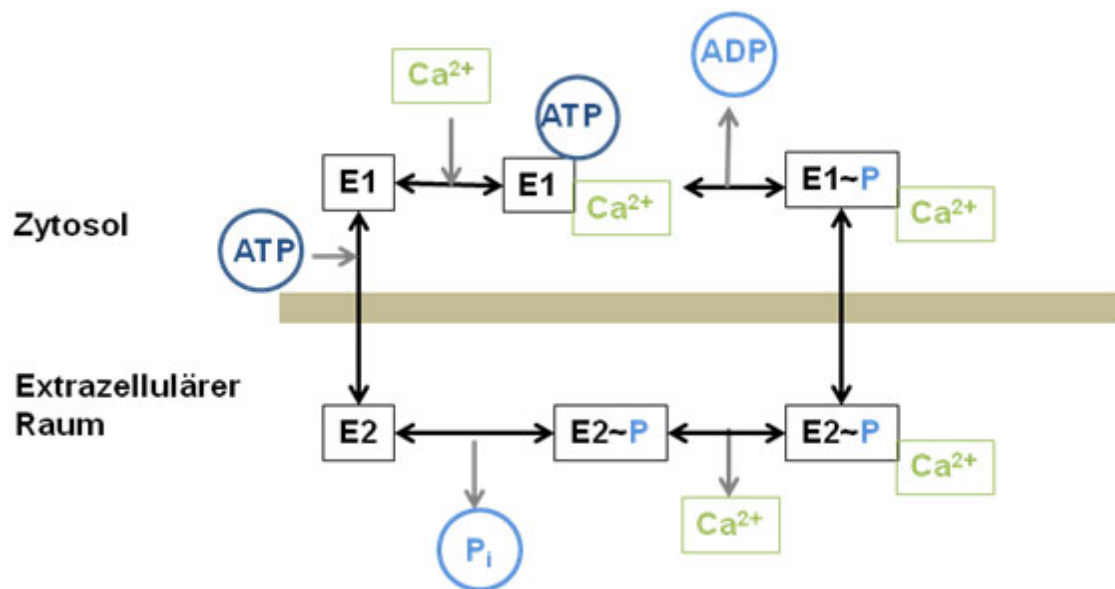


Abb. 6: Schematischer Reaktionszyklus des Kalziumtransportes der Zelle mittels der PMCA. Im Konformationszustand E₁ bindet ATP und ein Ca²⁺-Ion. Durch ATP-Hydrolyse und Phosphorylierung wird die ATPase in den Zustand E₂ versetzt. Dies führt zu einer Konformationsänderung im Enzym. Im phosphorylierten E₂-Zustand (E₂-P) ist die Ca²⁺-Affinität niedrig. Dies ermöglicht die Kalzium Freisetzung auf der extrazellulären Seite. Mittels Hydrolyse wird der Phosphat-Rest abgespalten und die ATPase kehrt in den E₁-Zustand zurück. (nach DiLeva et al. 2008)

Die Gesamtsequenz von Ratten- und humanen PMCA Isoformen wurde erstmals 1988 publiziert (Brandt et al. 1988; Shull & Greeb 1988; Verma et al. 1988). Insgesamt wird die PMCA bei Ratte und Mensch durch 4 separate Gene codiert, wodurch 4 Isoenzyme existieren (PMCA1 - 4) (Brandt et al. 1992; Latif et al. 1993; Olson et al. 1991; Wang et al. 1994). Durch alternatives Spleißen von Primärtranskripten sind theoretisch bis zu über 30 verschiedene PMCA Spleiß-Formen möglich, aber bei nicht allen dieser theoretischen Spleißvarianten konnte bisher gezeigt werden, dass sie existieren (Carafoli & Guerini 1993). Über 20 Spleißvarianten konnten auf mRNA Ebene nachgewiesen werden (Strehler 1990). Die Spleißstellen befinden sich in der NH₂-terminalen Region der Transduktionsdomäne (Spleißstelle A) und in der C-terminalen Region (Spleißstelle C) (Abb. 5).

Untersuchungen an Mäuseembryonen beschrieben PMCA1 ab dem ersten analysierten Entwicklungstag in allen Zellen (Zacharias & Kappen 1999). Desweiteren sind PMCA1 knock-out Mäuse embryonal letal (Prasad, et al. 2004). Erst am 12. Entwicklungstag des Mausembryos zeigten sich gewebsspezifisch weitere PMCA Isoformen. Dabei wurde die PMCA2 im nervalen System und in der sich entwickelnden retinalen Zellschicht des Auges

lokalisiert (Zacharias & Kappen 1999). Eine PMCA2 Expression wurde außerdem in der laktierenden Brustdrüse der Ratte und in cochlearen Haarzellen der Maus gefunden (Reinhardt & Horst 1999; Street, et al. 1998). Die mRNA für die Isoform PMCA3 wurde in humaner fetaler Skelettmuskulatur und Skelettmuskulatur der Ratte nachgewiesen (Greeb & Shull 1989; Stauffer et al. 1993). Weiterhin wurde die mRNA der PMCA2 und PMCA3 im Nierencortex und am äußeren Nierenmark der Ratte beschrieben (Caride, et al. 1998), wobei in humaner und Rattenniere kein PMCA2- und PMCA3-Protein nachgewiesen werden konnte (Stauffer, et al. 1995). Auch die PMCA4 wird erst mit fortschreitender Entwicklung des Mäuseembryos vermehrt exprimiert und dann ubiquitär lokalisiert (Zacharias & Kappen 1999). Im männlichen Reproduktionstrakt ist die PMCA4 Isoform im Rattenhoden, im Caput-Segment des Rattennebenhodens, im Stroma der Rattenkoagulationsdrüse (Post, et al. 2002; Wilhelm, et al. 2008) sowie in bovinen Hoden und Nebenhoden vorhanden (Brandenburger et al. 2011). Desweiteren konnte PMCA4-Protein in Spermatogonien, späten Spermatozyten und Spermatisden der Ratte (Wilhelm et al. 2008), sowie in Nebenhodenspermien der Ratte, der Maus und des Bullen lokalisiert werden (Brandenburger et al. 2011; Okunade et al. 2004; Post et al. 2010; Triphan et al. 2007; Wennemuth et al. 2003; Wilhelm et al. 2008).

1.3.3 Regulation der Plasmamembran- Ca^{2+} -ATPase

Die Ca^{2+} -Affinität der unstimulierten PMCA liegt bei $K_m > 10 \mu\text{M}$ (Niggli et al. 1981). Daher benötigt es Mechanismen die die Ca^{2+} -Affinität der PMCA erhöhen.

Ein wichtiger Aktivator ist Calmodulin. Calmodulin, ein Kalzium Modulator Protein, interagiert an der CaM-BD im C-terminalen Anteil der Pumpe (Abb. 5) (Caride et al. 1999; Enyedi et al. 1989). Bei niedriger zytoplasmatischer Kalziumkonzentration ($[\text{Ca}^{2+}] < 50 - 100 \text{ nM}$) liegt Calmodulin als inaktive Form vor. Dann dient die CaM-BD als „autoinhibitorische Domäne“, indem der C-terminale Anteil des PMCA-Proteins mit der 1. und 2. zytoplasmischen Schleife interagiert (Enyedi et al. 1989). Diese Interaktion verhindert eine Annäherung des ATP an die ATP-Bindungsstelle. Ein Anstieg der zytoplasmatischen Kalziumkonzentration führt zur Bildung des aktiven Ca^{2+} -Calmodulin-

Komplexes, welcher durch Bindung an die CaM-BD die Inhibition von PMCA aufhebt (Falchetto et al. 1992) und somit die Ca^{2+} - und ATP-Bindungsstelle freilegt. Die Ca^{2+} -Affinität der PMCA wird dabei auf einen $K_m < 1 \mu\text{M}$ gesenkt (Niggli et al. 1981). Alternatives Spleißen der PMCA im Bereich der C-Spleißstelle verändert die Calmodulin-autoinhibitorische Region und führt zu unterschiedlicher Stimulation des Enzyms mittels Calmodulin (Caride et al. 1999; Enyedi et al. 1994).

Weitere Regulatoren der PMCA-Aktivität sind cAMP-abhängige Proteinkinasen. Zum Beispiel phosphoryliert die cAMP-abhängige Proteinkinase PKA an der Konsensus-Stelle KRNS (Ser1178), die sich zwischen der CaM-BD und der C-terminalen Region der PMCA1 befindet. Dadurch wird die Ca^{2+} -Affinität auf $K_m = 1,4 \mu\text{M}$ gesenkt (James et al. 1989). Diese Phosphorylierungen am C-terminalen Anteil innerhalb der CaM-BD und der C-Spleißstelle der PMCA sind sehr komplex und können eine Aktivierung oder Hemmung der Pumpe hervorrufen, als auch über alternatives Spleißen die Regulation der PMCA-Aktivität mittels PKA und PKC beeinflussen (Dean et al. 1997; Enyedi, et al. 1997; Enyedi, et al. 1996; Wan et al. 2003).

Ein weiterer wichtiger Faktor für die Regulation der PMCA-Aktivität ist deren Lipidumgebung. Studien zeigen, dass saure Phospholipide (Phosphatidylsäure (PA), Phosphatidylserin (PS), Phosphatidylinositol (PI)) und langkettige ungesättigte Fettsäuren die Ca^{2+} -Affinität der PMCA steigern und die PMCA Aktivität stimulieren (Enyedi et al. 1987; Niggli, et al. 1981; Ronner, et al. 1977). Untersuchungen an gereinigter PMCA aus humanen Erythrozyten bewiesen, dass die PL-Region und die CaM-BD mit sauren Phospholipiden interagieren und dadurch die PMCA stimulieren. Die Bindung von sauren Lipiden an der CaM-BD beeinflussen dabei die Bindung von Calmodulin (Brodin, et al. 1992; Zvaritch et al. 1990).

Das Protein PDC-109, ein sekretorisches Protein aus dem Bläschendrüsensekret des Bullen, hat indirekt einen Einfluss auf die Aktivität der PMCA. Die Ca^{2+} -ATPase-Aktivität von Nebenhodenspermien kann durch das Protein PDC-109 stimuliert werden (Sanchez-Luengo, et al. 2004; Triphan, et al. 2007).

1.3.4 Bedeutung der Kalziumregulation in den Spermien

Einige Untersuchungen an Spermien zur Akrosomenreaktion (Breitbart 2002; Flormann et al. 2008), zur Spermienbeweglichkeit (Hyperaktivierung) (Marquez & Suarez 2004; Marquez & Suarez 2007; Serres et al. 1991; Suarez et al. 1993; Suarez & Ho 2003), zur Chemotaxis (Cook et al. 1994; Kaupp et al. 2006; Suarez & Ho 2003) und zur Kapazitation (Breitbart 2002; Fraser et al. 1995; Visconti et al. 1995) lassen darauf schließen, dass Kalzium eine wichtige Bedeutung in der Reproduktionsbiologie hat. Kalziumspeicher befinden sich in den Säugetierspermien im postakrosomalen Bereich und im Halsstück (Ho & Suarez 2003). Eine Mobilisierung von Kalzium aus dem Kalziumspeicher scheint eine Hyperaktivierung bei bovinen Spermien einzuleiten (Ho & Suarez 2003; Suarez 2008).

Serres et al. konnten an humanen ejakulierten Spermien zeigen, dass durch die Änderung der intrazellulären Kalziumkonzentration es zu einer veränderten Beweglichkeit des Flagellums kommt (Serres et al. 1991). Bovine Nebenhodenspermien aus dem Caput Segment haben eine $[Ca^{2+}]_i$ von 875 ± 55 nmol/l und aus dem Cauda Segment eine $[Ca^{2+}]_i$ von 155 ± 6 nmol/l (Vijayaraghavan & Hoskins 1990). Der hohe $[Ca^{2+}]_i$ -Gehalt in Caputspermien scheint, neben der niedrigen cAMP-Konzentration und einem begrenzten ATP Angebot eine wichtige Ursache für die Unbeweglichkeit unreifer Spermien zu sein (Brandt & Hoskins 1980). Weiterhin haben Untersuchungen an bovinen kryokonservierten Spermien gezeigt, dass eine verminderte Beweglichkeit und damit verminderte Fertilität der Spermien im Zusammenhang mit einem Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ steht (Bailey & Buhr 1994).

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Die Entwicklung männlicher Gameten umfasst die Differenzierung von unpolaren, unbeweglichen Spermien zu polaren, beweglichen Spermien. Dieser finale Schritt der Ausdifferenzierung und Modifizierung erfolgt post-gonadal in den Nebenhodentubuli und steht nicht unter genomischer Kontrolle. Daher wird postuliert, dass die Modifikation der Spermatozoen durch Interaktion der

Spermien mit dem epididymalen Sekret (sezernierte Proteine, Epididymosomen) und den epididymalen Epithelzellen erfolgt (Dacheux, et al. 2005; Fornes & De Rosas 1991). Diese Modifikation führt zu einer Veränderung der Lipid- und Proteinzusammensetzung, besonders an der Spermienplasmamembran.

In vorausgehenden Untersuchungen der Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass epididymale Spermien Ca^{2+} -ATPase-Aktivität aufweisen, die durch das Bläschendrüsensekretprotein PDC-109 um bis zu 150% gesteigert werden kann. Hoch interessant war, dass die Aktivität der Ca^{2+} -ATPase in den Spermien und deren Stimulierbarkeit durch PDC-109 vom Nebenhodenkopf zum Nebenhodenschwanz *in vitro* sich signifikant erhöhte (Sanchez-Luengo et al. 2004). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die PMCA4a in der Spermienmembran während der Passage der Spermien durch den Nebenhodentrakt zunahm (Brandenburger et al. 2011). Demzufolge stellte sich uns die Frage, wie es zu einer Erhöhung der Ca^{2+} -ATPase-Aktivität und der Zunahme von PMCA4a in der Spermienmembran entlang des Nebenhodentraktes kommt. Die Möglichkeit eines Zell-Zelltransfers der Ca^{2+} -ATPase von Vesikeln der Nebenhodenepithelzellen auf die Spermien wurde favorisiert. Daher war es Ziel der vorliegenden Arbeit den vesikulären Transfer („Transsekretion“) von Membrankomponenten (Proteine, Lipide) im allgemeinen und der Ca^{2+} -ATPase/PMCA im speziellen auf bovine Nebenhodenspermien zu erforschen.

Dazu sollten zunächst die bovinen Epididymosomen der verschiedenen Nebenhodenabschnitte (Caput, Cauda) hinsichtlich ihrer Morphologie, ihrer Lipidzusammensetzung, ihrer PMCA Ausstattung und Ca^{2+} -ATPase-Aktivität analysiert werden. In einem zweiten Abschnitt sollte untersucht werden, ob sich während der Passage der Spermien durch den Nebenhoden nicht nur die PMCA-Lokalisation und die Ca^{2+} -ATPase-Aktivität der Spermien ändert, sondern auch das Lipidspektrum. Zudem sollte anhand von *in vitro* Fusionsversuchen von Epididymosomen mit Nebenhodenspermien gezeigt werden, ob die oben genannten Komponenten übertragen werden oder sich verändern.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Alle Chemikalien waren von höchstmöglichem Reinheitsgrad und wurden, falls nicht anders vermerkt, von folgenden Firmen bezogen: Acros Organics (Geel, Belgien), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Roche (Mannheim), Sigma Aldrich (Deisenhofen), Serva (Heidelberg).

Antikörper wurden von ABCAM (Cambridge, UK), Amersham-Pharmacia (Freiburg), Affinity Bioreagents (Golden, USA), Biotrend (Cologne, Germany) Dianova (Hamburg) und Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, USA) erworben. Das Plastikverbrauchsmaterial wurde von Greiner (Nürnberg), Schleicher & Schuell (Dassel) und Eppendorf (Hamburg) geliefert. Das Fotomaterial zur Dokumentation stammte von Fuji (Düsseldorf) und Amersham-Biosciences (Freiburg).

Die folgenden Primärantikörper wurden in dieser Arbeit verwendet:

- α -PMCA, monoklonal (Klon 5F10, Affinity Bioreagents, Golden, USA)
- α -PMCA4, monoklonal (Klon JA9, Affintiy Bioreagents, Golden, USA)
- α -PMCA4a, polyklonal (Affinitätsgereinigt, in der Arbeitsgruppe hergestellt (Brandenburger et al. 2011))
- α -MIF, polyklonal (ABCAM, Cambridge, UK)
- α -LDH (Muskel), polyklonal (Biotrend, Cologne, Germany)

2.2 Tiermaterial

Bovine Nebenhoden wurden innerhalb einer Stunde nach Schlachtung bei einer Temperatur von 20 - 25°C aus dem Schlachthof (Marburg) ins Labor gebracht und dort sofort verarbeitet. Das gewonnene Material wurde für die weitere Verarbeitung bei 4°C gekühlt.

2.3 Methoden

2.3.1 Biochemische Methoden

2.3.1.1 Gewinnung boviner Nebenhodenvesikel (Epididymosomen) und Nebenhodenspermien

Die bovinen Nebenhoden wurden vom Marburger Schlachthof bezogen. Innerhalb einer Stunde nach der Schlachtung erfolgte eine vorsichtige Präparation des bovinen Nebenhodenkopfes und Nebenhodenschwanzes. Die unterschiedlichen Abschnitte des Nebenhodens wurden sofort in TRIS-NaCl-Isolierungspuffer gewaschen und von überflüssigem Blut und Gefäßen befreit. Danach wurden die Nebenhodenabschnitte sternförmig eingeschnitten und der Inhalt der Nebenhodengänge mit TRIS-NaCl-Isolierungspuffer ausgespült. Die Gewinnung der Nebenhodenspermien und Vesikel aus dem Nebenhodensekret erfolgte an Anlehnung des Protokolls von der Arbeitsgruppe Arienti zur Gewinnung von Spermien und Prostatosomen aus dem Ejakulat (Arienti et al. 1997a). Das Nebhodensekret wurde bei 700x g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Die sedimentierten Spermien wurden bei 4 °C bis zur Weiterverarbeitung aufbewahrt (Abb. 7).

Im verbliebenen Nebenhodensekret befanden sich nun noch vereinzelt Spermien und Zelltrümmer, sowie die Nebenhodenvesikel. Die Nebenhodenvesikel wurden über mehrere Zentrifugationsschritte (12.000x g, 20 min (Suprafuge 22, Hereaus Sepatech); 100.000x g, 1 h (L8-70M Ultrazentrifuge Beckmann)) bei 4°C gewonnen (Abb. 7) und in 1 ml TRIS-NaCl-Puffer aufgenommen.

Reinigung der Epididymosomen:

Um den Reinheitsgrad der Nebenhodenvesikel zu erhöhen, wurden diese über Gelfiltrationschromatographie (Sephadex G200 Säule) aufgetrennt. Als Laufpuffer diente der TRIS-NaCl-Puffer. Die Nebenhodenvesikel eluierten im Ausschlussvolumen und wurden anschließend bei 100.000x g für 1 h pelletiert und in Fusionspuffer aufgenommen (Abb. 7) (Arienti et al. 1997a).

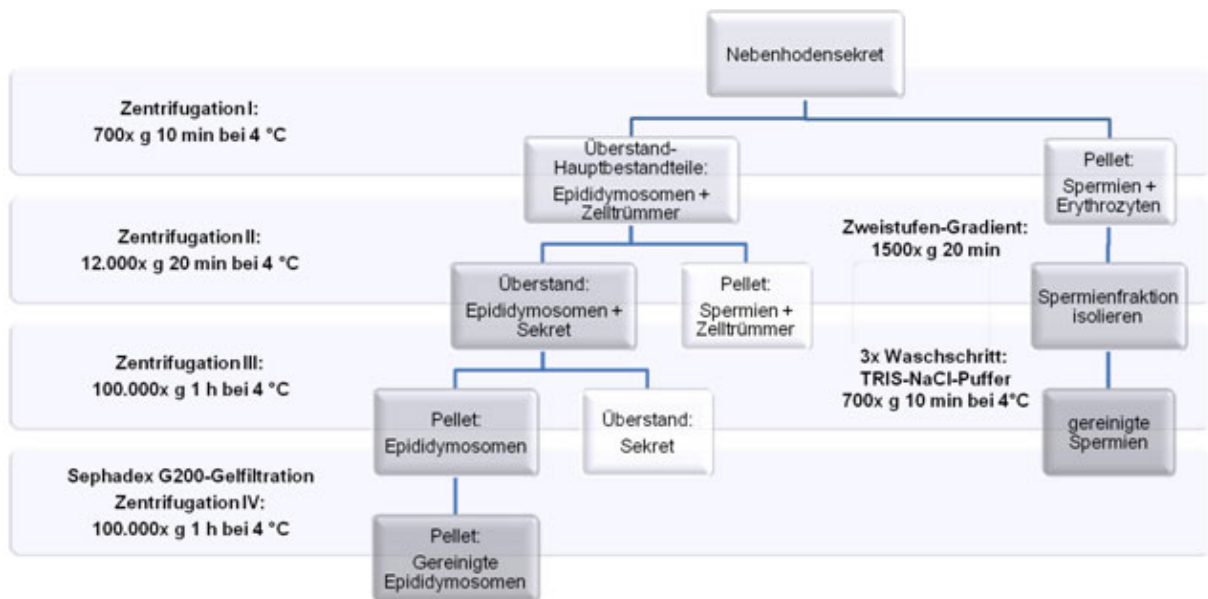


Abb. 7: Gewinnung boviner Nebenhodenvesikel und Nebenhodenspermien aus dem Nebenhodensekret über verschiedene Zentrifugations- und Waschschrte.

Reinigung der Spermien:

Da die pelletierten Spermien noch mit Erythrozyten, toten, amorphen Spermien und Zelltrümmern verunreinigt waren, wurden sie über einen diskontinuierlichen Dichtegradienten gereinigt. Als Gradientenmedium wurde OptiPrep (Axis-Shield) verwendet. Dabei handelt es sich um 60%iges (w/v) in Wasser gelöstes Iodixanol mit einer Dichte von 1,32 g/ ml. Für die Isolation von morphologisch normalen Spermien wurde ein Zweistufen-Gradient mit den Dichten 1,119 g/ ml und 1,154 g/ ml angefertigt. Das Spermienpellet wurde mit gleichem Volumen TRIS-NaCl-Puffer und OptiPrep gemischt (Dichte: 1,170 g/ ml) und der Zweistufen-Gradient damit unterschichtet (Abb. 8). Der Gradient wurde in einem Ausschwingrotor (Heraeus #7591) bei 20 °C, 1500x g für 20 min zentrifugiert. Nach der Zentrifugation befanden sich in der ersten Schicht amorphe Spermien, Spermienköpfe, Spermienchwänze und Blutzellen. Die zweite Schicht beinhaltete die lebenden, motilen, ganzen Spermien. In der dritten Schicht befanden sich die amotilen Spermien (Abb. 8). Die zweite und dritte Schicht wurden für die Weiterverarbeitung mit Hilfe einer Glaspipette abgesaugt und dreimal bei 700x g mit TRIS-NaCl-Puffer gewaschen. Mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer wurde die Anzahl der Spermien bestimmt.

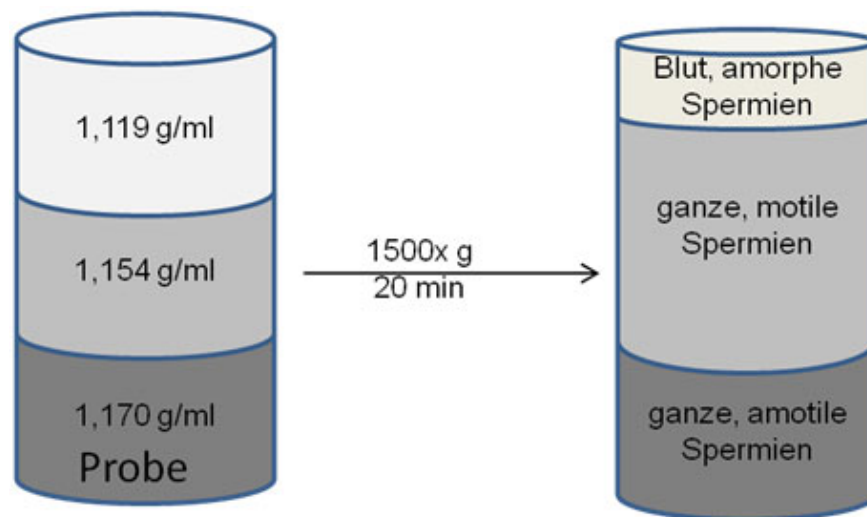


Abb. 8: Reinigung von Nebenhodenspermien über einen diskontinuierlichen Iodixanol-Gradienten (OptiPrep).

TRIS-NaCl-Isolierungspuffer:

10 mM TRIS
1 mM EDTA
150 mM NaCl
→ pH 7.5
250 mM Sucrose

TRIS-NaCl-Puffer:

10 mM TRIS
1 mM EDTA
150 mM NaCl
→ pH 6.5

Fusionspuffer :

0,32 mol/l Sucrose
20 mmol /l MES (pH= 5 - 6.5)
oder
2 mmol/l HEPES (pH= 7 - 8)
1 mM ZnCl₂

2.3.1.2 Herstellung einer Mikrosomenfraktion

Die Mikrosomen wurden aus den gereinigten Spermien nach Sikdar et al. (1991) gewonnen (Sikdar, et al. 1991). Dafür wurden die Spermien in Imidazolpuffer aufgenommen und mit einem Glaspotter homogenisiert. Anschließend wurde das Homogenat bei 600x g bei 4 °C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde aufgehoben und das Pellet erneut homogenisiert. Nach drei Durchgängen wurde der gepoolte Überstand 10 min bei 12.000x g und anschließend 1 h bei 100.000x g zentrifugiert. Die im Pellet befindlichen Mikrosomen wurden in Imidazolpuffer für die weitere Verwendung aufgenommen.

Imidazolpuffer:

25 mM Imidazol
1 mM EDTA
1 mM DTE
250 mM Sucrose
→ pH 7.5 + Inhibitor Complete, Roche Mannheim

2.3.1.3 Proteinbestimmung

Die Proteinkonzentration der Probe (Spermien, Spermienmembran, Nebenhodenvesikel) wurde durch die Methode nach Bradford ermittelt (Bradford 1976). Der Test basiert auf einer Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffes Coomassie Blau G-250 (Serva) in saurer Lösung nach Proteinbindung von 470 nm auf 595 nm. Diese Änderung kann photometrisch ermittelt werden. Dazu wurden 20 µl Probe mit je 1 ml Coomassie Blau G-250-Lösung versetzt und 10 min bei RT inkubiert. Als Leerwert diente der verwandte Puffer. Danach wurde die Extinktion bei 595 nm im Photometer (Utrospec® III, Pharmacia, Freiburg) gegen den Leerwert bestimmt. Als Standard diente in 0,1 M NaOH gelöstes Ovalbumin.

Coomassie Blau G-250:

100 mg Coomassie Blau G-250
50 ml Ethanol
100 ml 85 % (w/v) H₃PO₄
Ad. 1000 ml Aqua dest.

2.3.1.4 *In vitro* Fusion boviner Spermien mit Octadecylrhodamin B markierten Epididymosomen

Der in dieser Arbeit angewandte Versuchsaufbau orientiert sich an den Angaben der Arbeitsgruppe Arienti, die ejakulierte Spermien mit Prostatosomen mittels R18-dequenching *in vitro* fusionierten und diese Methodik an Spermien etablierten (Arienti et al. 1997a; Palmerini et al. 1999).

Um die Fusion von bovinen Spermien mit Epididymosomen untersuchen zu können, wurden die Epididymosomen zunächst mit dem Fluoreszenzfarbstoff Octadecylrhodamin B nach einem Protokoll zur Markierung von Prostatosomen beladen (Arienti et al. 1997a; Palmerini, et al. 1999). Dazu wurden gewonnene Epididymosomen in 50 µl TRIS-NaCl-Puffer (pH 7,5) resuspendiert und mit 1 mg/ml Octadecylrhodamin B (R18) (Pierce Thermo Scientific, Rockford) 1 h bei RT im Dunkeln inkubiert. Dabei lagerten sich R18-Dimere in die Membran der Epididymosomen ein. Nach der Inkubationszeit wurden die R18 markierten Epididymosomen mittels einer Gelfiltrationschromatographie (Sephadex G50) von überschüssigem R18 getrennt. Als Laufmittel diente der TRIS-NaCl-Puffer

(pH 7,5). Die Epididymosomen eluierten im Ausschlussvolumen. Die kleinen überschüssigen R18 Moleküle eluierten mit deutlichem Abstand von den Epididymosomen aus der Säule.

Der Verlauf der Fusion von beladenen Epididymosomen mit unbeladenen Spermien wurde über ein Delta Scan Illuminationssystem bei unterschiedlichen pH-Werten (pH 5, pH 7, pH 8) und bei einer konstanten Temperatur von 37 °C dokumentiert. Dabei wurden unbeladene Spermatozoen in eine Küvette mit 0,32 mol/ Sucrose + 20 mmol/l MES (pH 5) oder 2 mmol/l HEPES (pH 7, pH 8) transferiert. Durch Zugabe der R18-beladenen Epididymosomen zu den unbeladenen Spermien wurde die Fusion eingeleitet. Ab diesem Zeitpunkt (t= 30 sec.) erfolgte die Messung über einen Zeitraum von 10 min. Das Protein-Verhältnis der Spermien zu den Epididymosomen betrug 2:1. Kam es während der Messung zur Fusion zwischen beladener und unbeladener Membran, so wurden aus den R18-Dimeren stärker leuchtende Monomere (Abb. 9). Diese Steigung der Fluoreszenz wurde bei einer Emission von $\lambda = 580$ nm (Extinktion $\lambda = 560$ nm) gemessen. Durch Zugabe von unbeladenen Epididymosomen zu den Spermien wurde keine Änderung der Fluoreszenzintensität gemessen. Zur Kalibrierung der Fluoreszenzmessung, wurde die Fluoreszenzintensität unmittelbar nach Zugabe der beladenen Vesikel zu den unbeladenen Spermien gleich 0% und die Fluoreszenzintensität nach Zugabe von 1% TritonX-100 (v/v, Endkonzentration) (nach t= 600sec.) gleich 100% gesetzt. Durch die Zugabe von TritonX-100 wurde eine komplette Durchmischung der Lipidphasen erzielt.

Die prozentuale Fusion wurde aus dem prozentualen Fluoreszenzanstieg nach folgender Formel berechnet (Corazzi et al. 1991):

$$F = FI \times (I + r)/I$$

F - prozentuale Fusionsrate

FI - prozentuale Fluoreszenz

I - Proteinmenge (μ g) unmarkierter Spermien

r - Proteinmenge (μ g) R18-markierter Epididymosomen

Zusätzlich wurden die Fluoreszenzänderungen auf Spermienausstrichen nach Fusion mit R18 beladenen Epididymosomen dokumentiert. Hier wurde zusätzlich zu den oben genannten pH-Werten auch die Fusion bei pH 6,5 durchgeführt, welcher dem physiologischen pH-Wert des Nebenhodens entspricht.

Fusionspuffer:

0,32 mol/l Sucrose

1 mM ZnCl₂

20 mmol/l MES (pH 5 - 6.5)

bzw.

2 mmol/l HEPES (pH 7 - 8)

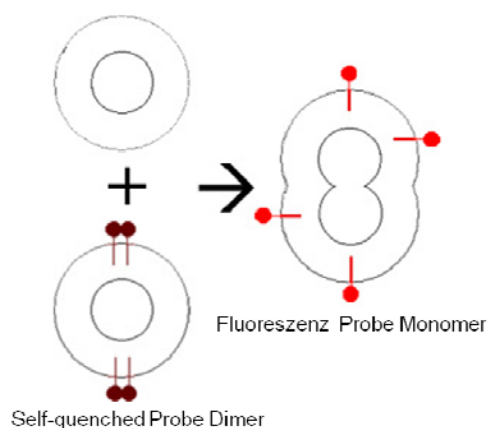


Abb. 9: Schematische Darstellung zur Funktionsweise vom Octadecylrhodamin B (R18). Kommt es zur Fusion, so trennen sich die Dimere. Dieses Auseinanderdriften führt zu einem Anstieg der Fluoreszenz. Die Messung erfolgt bei $\lambda = 580$ nm.

2.3.1.5 Biotinylierung der Epididymosomen, *in vitro* Fusionierung und Detektion von biotinylierten Proteinen

Die Biotinylierung der Epididymosomen, die *in vitro* Fusion und Detektion biotinylierter Proteine erfolgte nach der Methode der Arbeitsgruppe Frenette (Frenette et al. 2002). Die Epididymosomen wurden in 0,15 M NaCl Lösung über mehrere Zentrifugationsschritte gewonnen (Abb. 7), über Gelfiltrationschromatographie (Sephadex G200) gereinigt und bei 100.000x g 1 h pelletiert. Die im Pellet befindlichen Epididymosomen wurden anschließend in 250 μ l PBS aufgenommen und mit EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin (Pierce) für 30 min bei RT nach Angaben von Frenette et al. 2002 gekoppelt (500 μ g Protein Epididymosomen mit 0,7 mg Biotin). Danach wurde zu dem Epididymosomen-Biotin-Gemisch 3750 μ l 0,15 M NaCl Lösung gegeben und diese bei 100.000x

g (Beckmann Ultrazentrifuge) pelletiert. Das Pellet wurde in 100 µl 0,15 M NaCl Lösung aufgenommen und bei -80 °C gelagert.

Da primäre Aminosäuren (z.B. TRIS) der Biotinylierung von Proteinen entgegenwirken, wurde für die Gewinnung der Spermien und der Epididymosomen, sowie zum Waschen der Spermien nach der Fusion isotone 0,15 M NaCl-Lösung verwendet (Frenette, et al. 2002).

Die Fusion von Biotin-markierten Epididymosomen mit Spermien erfolgte in Fusionspuffer (pH 6.5) (siehe Kapitel 2.3.1.6, S. 31). Für weitere Analysen wurden die Spermien entweder auf einen Objekträger ausgestrichen (siehe Kap. 2.3.2.1, S. 43f) oder die Mikrosomen für die Westernblot-Analyse gewonnen (siehe Kap. 2.3.1.2, S. 27 und Kap. 2.3.1.7 – 2.3.1.9, S. 31ff).

PBS:

137 mM NaCl
2,7 mM KCl
12 mM Na₂HPO₄
12 mM KH₂PO₄
→ pH 7,4

2.3.1.6 *In vitro* Fusion von Nebenhodenspermien mit unmarkierten Epididymosomen

Das Fusionsexperiment mit R18 markierten Epididymosomen belegte eine Fusion von Epididymosomen mit Spermien bei pH-Wert 5,0 und 6,5. Für die weiteren Analysen wurde die Fusion bei dem physiologischen pH-Wert des Nebenhodens von 6,5 (0,32 mol/ l Sucrose + 20 mmol/ l MES + 1mM ZnCl₂) durchgeführt. Desweiteren wurde für die folgenden Analysen (Ca²⁺-ATPase-Aktivitätsmessung, Lipidanalysen, Immunfluoreszenz) die Spermienanzahl und nicht der Proteingehalt benötigt. Daher wurde bei folgenden *in vitro* Fusionen jeweils 10⁷ Spermien mit 50 µg Epididymosomen verwendet, was einem Proteinverhältnis von 2:1 glich.

Um eine Veränderung durch Übertragung von Membranbestandteilen zu dokumentieren, inkubierte das Gemisch aus Spermien und Epididymosomen im Fusionspuffer bei 37 °C für 3 h im Brutschrank (Frenette et al. 2002). Danach

erfolgte eine Trennung der Spermien von den Epididymosomen über mehrere Zentrifugationsschritte (3 mal 700 x g, 10 min), wobei die pelletierten Spermien jedesmal in TRIS-NaCl-Puffer gewaschen wurden. Die im Überstand befindlichen Epididymosomen wurden verworfen und die Spermien für weitere Analysen verwendet.

Fusionspuffer:

0,32 mol/ l Sucrose
20 mmol/ l MES (pH 6,5)
1 mM ZnCl₂

TRIS-NaCl-Puffer:

10 mM TRIS
1 mM EDTA
150 mM NaCl
→ pH 7.5

2.3.1.7 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Wanderung der Proteine von der Kathode zur Anode in einem elektrischen Feld wird durch deren Bindung an SDS-Anionen ermöglicht, wobei die Eigenladung der Proteine kompensiert wird und stark negativ geladene Komplexe entstehen. Die Proteine wurden zunächst durch ein Gel mit geringer Acrylamidkonzentration (4% Sammelgel) an einer Lauffront gesammelt, um anschließend in einem so genannten Trenngel der Größe nach aufgetrennt zu werden. Die Porengröße des jeweiligen Gels, die durch den Acrylamid/ NN'Bisacrylamid-Gehalt bestimmt wird, ist für den Grad der Auftrennung verantwortlich.

Gelherstellung

5 ml Trenngellösung wurde mit 2,5 µl Tetramethylethyldiamin (TEMED) und 25 µl 10%iger Ammoniumpersulfatlösung (APS) versetzt und in die vorbereitete Mini-Gelkammer (6 x 8 cm x 1 mm; Keutz) gefüllt. Das Gel wurde mit Aqua dest. überschichtet, um eine gerade Gelkante zu erhalten. Nach erfolgter Polymerisation (ca. 45 min) wurde das Aqua dest. entfernt. 1 ml Sammelgellösung wurde mit 1 µl TEMED und 5 µl 10%iger APS-Lösung vermischt, auf das Trenngel gegossen und der Probenkamm eingefügt. Die Polymerisation des Trenngels erfolgte über Nacht. Tab. 1 gibt eine Übersicht über die Zusammensetzung der verwendeten Gellösungen wieder.

Die Probe wurde im Verhältnis 1:2 mit Probenpuffer versetzt, 10 min bei 95 °C gekocht, bei 5000x g 5 min zentrifugiert und der Überstand in die Probentaschen pipettiert. Für den Nachweis der PMCA wurden die Proben mit Probenpuffer und 2 mol/ l $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$ versetzt und ohne kochen zentrifugiert (Filoteo, et al. 2000). Neben den Proben wurden zusätzlich Eichproteine (Biorad, München) mit bekanntem Molekulargewicht aufgetragen, um eine Größenzuordnung zu ermöglichen. Die äußere und innere Elektrophoresekammer wurde mit Elektrophoresepuffer aufgefüllt. Die Laufzeit der Elektrophorese betrug ca. 50 min bei 200 V (konstant). Im Anschluss wurden die Proteinbanden mit Coomassie-Blau-R250 gefärbt oder durch Nass-Blot auf eine Trägermembran Polyvinylidenfluorid (PVDF) (Milipore, Schwalbach) transferiert.

Tab. 1: Zusammensetzung der für die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese verwendeten Gellösungen

Sammelgel 5 ml		Trenngel 10 ml	
Konzentration	4%	Konzentration	7,5%
Aqua dest.	3 ml	Aqua dest.	4,01 ml
0,5 M TRIS-HCl pH 6.8	1,25 ml	1,5 M TRIS-HCl pH 8.8	2,5 ml
10% SDS	50 µl	10% SDS	100 µl
Acrylamid/Bisacrylamid (Rotiphorese 30, Roth)	0,65 ml	Acrylamid/Bisacrylamid (Rotiphorese 30, Roth)	3,37 ml

Probenpuffer (PP):

4 ml Aqua dest.
 1 ml 0,5 M Tris/ HCl (pH 6,8)
 0,8 ml Glycerin
 1,6 ml 10 % (w/v) SDS
 200 µl 0,05 % Bromphenolblau in Aqua dest.
 2% β-Mercaptoethanol

Elektrophoresepuffer:

25mM Tris
 186 mM Glyzin
 3,5 mM SDS

2.3.1.8 Coomassie-Blau-Färbung von Proteingelen

Die Proteinbanden wurden nach der Elektrophorese für 30 min bei 65 °C in Coomassiefärbelösung gefärbt. Die Lösung wurde gegen den Entfärber ausgetauscht und das Gel bei RT entfärbt. Der Entfärber wurde mehrfach gewechselt bis die Proteinbanden gut sichtbar waren.

Coomassiefärbelösung:

0,1 % Coomassie-Blau R-250
40 % Methanol
10 % Essigsäure

Entfärbelösung:

40 % Methanol
10 % Essigsäure
0,5 % CuSO₄

2.3.1.9 Westernblot-Analyse

Beim Transfer von Proteinen auf eine Trägermembran (PVDF) werden die durch ihre Bindung an SDS-Anionen negativ geladenen Proteine durch ein elektrisches Feld auf eine Trägermembran mit hoher Proteinaffinität übertragen. In der Abb. 10 ist der schematische Aufbau eines Nass-Blot dargestellt.

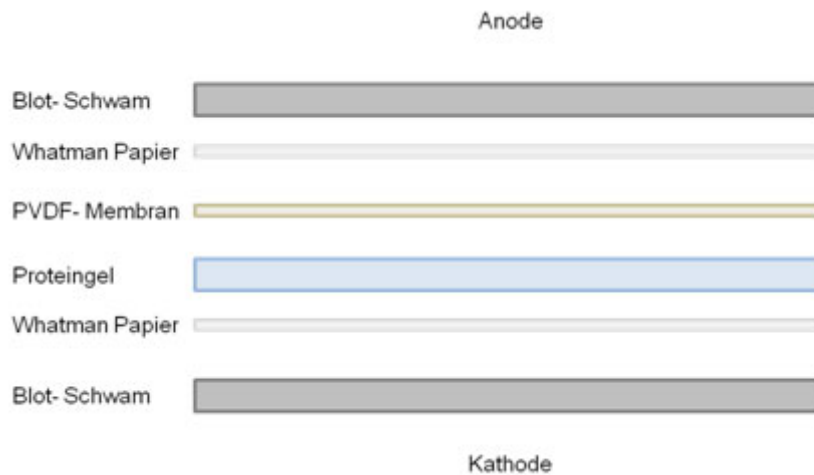


Abb. 10: Schematische Darstellung eines Nass-Blot-Aufbaus zum Proteintransfer (Biorad)

Beim Aufbau eines Blots wurde besonders auf die Vermeidung von Luftblasen zwischen den einzelnen Schichten geachtet, so dass ein vollständiger Transfer der Proteine aus dem Gel auf die Membran gewährleistet war. Die Proteine wurden bei Raumtemperatur für 3 h mit 200 mA oder über Nacht mit 35 mA geblottet.

Im Anschluss wurde kontrolliert, ob eine Übertragung der Proteine stattgefunden hat. Dazu wurde die Membran 2 - 3 min in Ponceau S-Lösung inkubiert und anschließend mit Aqua dest. entfärbt. Darauf folgte für 1 h die Blockierung in Blockierungspuffer (5% Magermilchpulver gelöst in Waschpuffer), um unspezifische Bindungsstellen an der Membran abzusättigen.

Die Inkubation des Blots mit einem Primärantikörper (Tab. 2) in Blockierungspuffer erfolgte über Nacht in einer feuchten Kammer bei 4°C. Danach wurde überschüssiger Antikörper durch dreimaliges Waschen für jeweils 10 min mit Waschpuffer entfernt. Die Membran wurde anschließend für 1 h bei RT mit einem POD gekoppelten Sekundärantikörper (Tab. 2) inkubiert und in Folge nochmals mit Waschpuffer gewaschen (3 x 10 min). Die bei der Westernblot-Analyse angewendeten primären und sekundären Antikörper sind mit ihrer jeweiligen Verdünnung in der Tab. 2 aufgeführt.

Der Nachweis des Immunkomplexes erfolgte mit dem "enhanced chemiluminescence system" (ECL, Amersham-Pharmacia, Braunschweig). Am Ort der Immunreaktion kam es zur Emission von Licht, welches durch Auflage eines Röntgenfilms (Hyperfilm-ECL) detektiert wurde.

Tab. 2: Verwendete Antikörper in der Westernblot-Analyse

Primärer Antikörper:	Verdünnung
α-PMCA (Klon 5F10, monoklonal) (ABR)	1:1000
Sekundärer Antikörper:	
α-Maus-POD (Amersham Biosciences)	1:3000
Primärer Antikörper:	
α-PMCA4 (Klon JA9, monoklonal) (ABR)	1:1000
Sekundärer Antikörper:	
α-Maus-POD (Amersham Biosciences)	1:3000
Primärer Antikörper:	
α-PMCA4a (polyklonal) (Brandenburger et al. 2011)	1:100
Sekundärer Antikörper:	
α-Kaninchen-POD (Amersham Biosciences)	1:3000
Primärer Antikörper:	
α-MIF (polyklonal) (Abcam)	1:1000
Sekundärer Antikörper:	
α-Kaninchen-POD (Amersham Biosciences)	1:3000
Primärer Antikörper:	
α-LDH (Muskel, polyklonal) (Biotrend)	1:1000
Sekundärer Antikörper:	
α-Kaninchen-POD (Amersham Biosciences)	1:3000
Antikörper zum Nachweis von Biotin:	
Streptavidin-HRP-Komplex (Amersham Biosciences)	1:3000

<u>Transferpuffer:</u>	<u>Ponceau S Lösung.:</u>	<u>Waschpuffer:</u>
25 mM Tris	0,2% (w/v) Ponceau S	150 mM NaCl
192 mM Glycin	3% (w/v) Trichloressigsäure	7,7 mM Tris- HCl, pH 7.5
20% Methanol		0,3% Tween 20

2.3.1.10 Bestimmung der Mg^{2+} -abhängigen und -unabhängigen Ca^{2+} -ATPase-Aktivität

Die Ca^{2+} -ATPase-Aktivität wurde nach Sikdar et al. (1991) bestimmt. Die Mg^{2+} -abhängige bzw. -unabhängige Ca^{2+} -ATPase spaltet ATP unter Freisetzung eines anorganischen Phosphates (P_i) zu ADP. Das freigesetzte P_i kann durch Zugabe von Ammoniummolybdat und Ascorbinsäure komplexiert und bei 820 nm kolorimetrisch bestimmt werden.

2 μ g Nebenhodenvesikel bzw. 10^6 Spermien wurden in einem Reaktionsvolumen von 250 μ l mit dem Reaktionspuffer (Mg^{2+} -unabhängige Ca^{2+} -ATPase-Aktivität: Imidazol- Puffer; Mg^{2+} -abhängige Ca^{2+} -ATPase-Aktivität: Histidinpuffer) (Sikdar et al. 1991) versetzt und die Reaktion durch Zugabe von 3 mM ATP gestartet. Nach 30minütiger Inkubation bei 37 °C wurde die Reaktion durch Zugabe von 70 μ l 30%iger eiskalter TCA gestoppt und 550 μ l Aqua dest. zugesetzt. Durch das Hinzufügen von je 100 μ l 2%iger Ascorbinsäure sowie 1,75%igem Ammoniummolybdat erfolgte die Komplexierung des freigesetzten anorganischen Phosphates (P_i). Der Ansatz wurde 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und das komplexierte P_i bei 820 nm im Photometer gemessen. Die ermittelte Ca^{2+} -ATPase-Aktivität ergab sich jeweils aus der Differenz der gemessenen Werte mit und ohne $CaCl_2$ -Zugabe. Endogenes Ca^{2+} wurde dabei durch im Puffer befindliches EDTA komplexiert. Mittels einer KH_2PO_4 Standardkurve konnte für jeden Extinktionswert bei 820 nm das freigesetzte P_i als μ mol P_i / mg Protein/ h errechnet werden.

Zur Stimulation der Ca^{2+} -ATPase-Aktivität wurden 20 μ g PDC-109 vor der Zugabe von ATP ins Reaktionsgemisch gegeben. Die genaue Menge für eine maximale Stimulation der Ca^{2+} -ATPase-Aktivität durch PDC-109 wurde in vorherigen Untersuchungen der Arbeitsgruppe ermittelt (Sanchez-Luengo et al.

2004). Die Reinigung von PDC-109 aus dem bovinen Bläschendrüsensekret ist im folgenden Kapitel (Kap. 2.3.1.11 S. 36f) beschrieben.

Imidazol-Puffer pH 8.5: Histidin- Puffer pH 7.5:

500 mM Imidazol	300 mM Histidinchlorid
1 mM EDTA	10mM EDTA
1 mM DTT	1mM DTE
250 mM Sucrose	250mM Sucrose

2.3.1.11 Reinigung von PDC-109 aus dem Bläschendrüsensekret des Bullen

PDC-109 bindet spezifisch an Heparin. Dadurch war es möglich, PDC-109 mittels Affinitätschromatographie an Heparinsepharose aus dem Sekret der bovinen Bläschendrüse zu isolieren. Das Sekret der Bläschendrüse wurde manuell ausgepresst und in 50 mM TRIS-HCl-Puffer pH 7,4 aufgefangen. Nachdem das Sekret bei 12.000x g zentrifugiert worden war, wurde der Überstand auf eine mit 50 mM TRIS-HCl-Puffer equilibrierte Heparin-Sepharose-Säule aufgetragen. Um nicht gebundenes Protein zu entfernen, wurde die Säule mit 5fachen Säulenvolumen TRIS-HCl-Puffer gewaschen. PDC-109 wurde mittels Eluierungspuffer von der Heparin-Sepharose-Säule gelöst. Dies ist möglich, da das Phosphorylcholin im Eluierungspuffer eine höhere Affinität zu PDC-109 als zu Heparin besitzt und daher das an die Heparinsäulenmatrix gebundene PDC-109 lösen kann. Die Proteinbestimmung erfolgte nach Bradford. Die Reinheit des gewonnenen PDC-109 wurde mittels SDS-Page (15%igem Trenngel) und anschließender Färbung mit Coomassie-Blau überprüft.

TRIS-HCl-Puffer:

50 mM TRIS-HCl
150 mM NaCl
5 mM EDTA
pH 7,4

Eluierungspuffer:

50 mM TRIS-HCl
150 mM NaCl
5 mM EDTA
10 mM Phosphorylcholin
pH 7,4

2.3.1.12 Lipidanalyse

Zur qualitativen und quantitativen Bestimmung der Lipidzusammensetzung in den Epididymosomen und ganzen Spermatozoen vor und nach *in vitro* Fusion wurden die extrahierten Lipide in einer Dünnschichtchromatographie analysiert und deren Gesamtphospholipid- und -cholesterolgehalt bestimmt.

2.3.1.12.1 Lipidextraktion nach Thomas R. Appel

Die Extraktion der Lipide aus der Epididymosomenmembran bzw. der Spermienmembran erfolgte in einem 2 ml Reaktionsgefäß (Low binding polymer technology; BioSciences) mit jeweils 80 µl Probe (150 µg Protein Epididymosomen bzw. 10^7 unfusionierte bzw. fusionierte Spermien). Zur Probe wurden 200 µl Methanol und 100 µl Chloroform hinzugegeben (Abb. 11). Um die Spermienzellen bzw. Epididymosomen aufzubrechen, wurde das Methanol-Chloroform-Proben-Gemisch für 10 min sonifiziert. Da Methanol als Lösungsvermittler zwischen Chloroform und der wässrigen Phase wirkt, wurde zu dem Gemisch 1 mM KCl gegeben. Dadurch bildete sich eine polare Oberphase (OF) und eine unpolare Unterphase (UF). Die Verwendung von KCl führt zur Erhöhung der Polarität der wässrigen Phase, und daher auch zu einer verbesserten Extraktion der Lipide in die unpolare UF. Nach einer kurzen Zentrifugation des Probengemisches bei 3000x g bestand die OF aus Methanol und 1 mM KCl und die UF aus Chloroform und gelösten Lipiden.

Da im ersten Schritt nicht die gesamten Lipide aus der Oberphase extrahiert wurden, wurde zur „Waschung“ der OF bzw. UF eine sogenannte „synthetische Phase“ (sOF, sUF) verwendet, die statt der Probe Wasser enthielt. Dabei wird die OF mit der sUF gereinigt und so die restlichen Lipide aus der OF in die sUF extrahiert. Dies wurde zweimal wiederholt und die UF mit den sUF vereinigt (vUF) (Abb. 11).

Da es sich um extrem kleine Mengen handelt, kann es zur Übertragung von OF-Anteilen in die vUF kommen. Daher wurde anschließend die vUF mit der sOF gereinigt und erneut bei 3000x g 1 min zentrifugiert. Danach wurde die

sOF entfernt und die gereinigte vUF (wUF) über die Speed Vac getrocknet (Abb. 11).

Das durch die Speed Vac eingetrocknete Lipidextrakt wurde entweder bei -20 °C gelagert oder für weitere Analysen in 20 µl Chloroform/Methanol Gemisch im Verhältnis 2:1 aufgenommen.

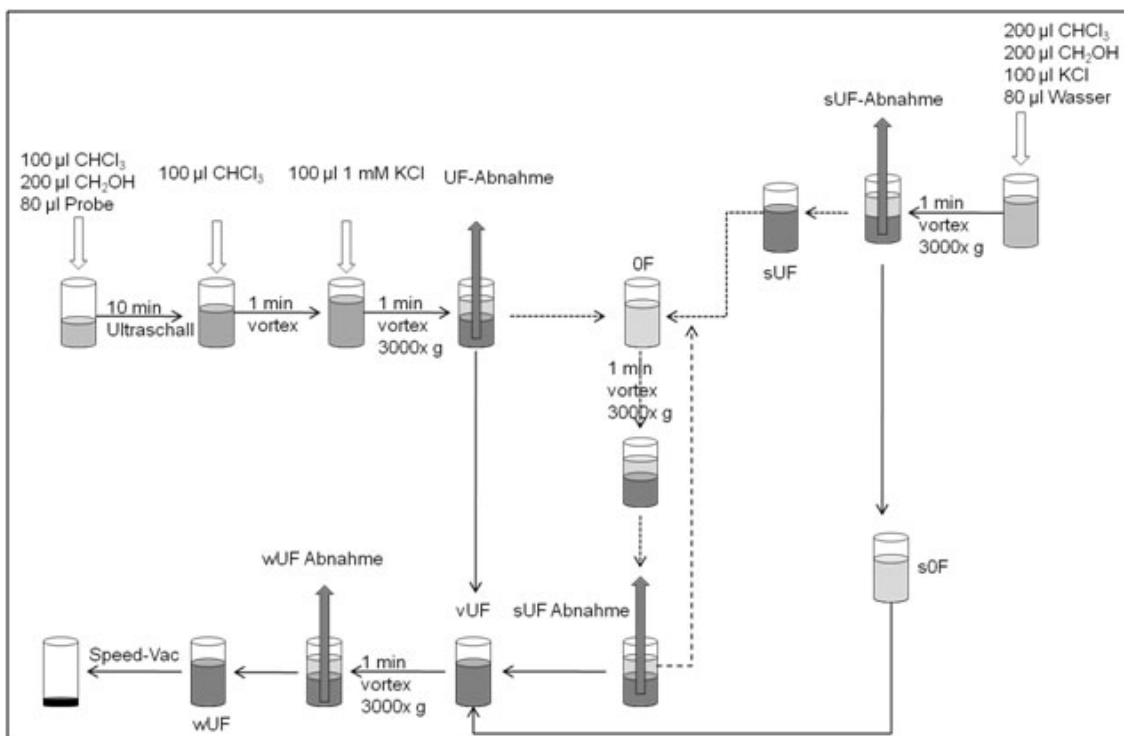


Abb. 11: Schema zur Lipidextraktion. UF- Unterphase; OF- Oberphase; sUF/sOF- synthetische Unter-/Oberphase; vUF- gesammelte UF/sUF; wUF- gewaschene Unterphase. (Modifiziert nach: Thomas R. Appel)

Herstellung der synthetischen Phase (sUF, sOF):

200 µl Chloroform
200 µl Methanol
80 µl H₂O
100 µl KCl
→ 1 min vortexen → 1 min 3000x g

2.3.1.12.2 Dünnschichtchromatographie

Für die Trennung der Lipide über Dünnschichtchromatographie wurde deren unterschiedliche Polarität ausgenutzt. Als stationäre Phase dient auf der Glasplatte fixiertes Kieselgel. Die freien Hydroxylgruppen des Kieselgels treten mit den Lipiden umso mehr in Wechselwirkung, je polarer die Lipide sind. Die auf die Dünnschichtplatte aufgetragenen Lipide werden über Laufmittel (LM 1 -

LM 3) transportiert (mobile Phase), welche durch Kapillarkräfte aufsteigen. Es wurde mit einem relativ polaren Laufmittel (LM 1) begonnen und anschließend ein weniger polares (LM 2) und schließlich ein unpolares Laufmittel (LM 3) benutzt. Durch die unterschiedlich starke Wechselwirkung der Lipide mit der stationären Phase einerseits und der mobilen Phase andererseits, legen die Lipide unterschiedlich lange Strecken auf der Trennschicht des Kieselgels zurück. Dabei laufen die unpolaren Lipide am weitesten mit dem polaren LM 1 mit. Die Trennung der Lipidklassen wird bereits nach der Inkubation mit LM 1 zum größten Teil erreicht. Die Bandenfokussierung, sowie die bessere Trennung der unpolaren Lipidklassen erfolgt über LM 2 und LM 3.

Für diese Untersuchungen wurden die Dünnschichtplatten vorentwickelt. Dafür inkubierte die Dünnschichtplatte für 35 – 40 min im LM 1. Danach wurde die Platte getrocknet und für 10 min bei 110 °C im Heizschrank aktiviert. Nach der Aktivierung wurde auf der Platte die Entwicklungshöhe für LM 1 (40 mm) mit Bleistift markiert, sowie die Probenauftragungspunkte festgelegt. Die bei der Lipidextraktion gewonnenen Proben (2 µl) wurden auf je einem Probenauftragungspunkt aufgetragen. Danach erfolgte die chromatographische Trennung der Lipide in LM 1. Nach anschließender Trocknung erfolgte die Chromatographie in LM 2 und darauf folgend in LM 3. Nach dem nochmaligen Trocknen, wurde die Platte für 1 - 3 sek. in Färbelösung getaucht, um die Lipidbanden zu detektieren, und dann für 10 min bei 170 °C im Heizschrank entwickelt. Für die quantitative Auswertung mit dem Programm SCION IMAGE wurden die Phospholipidstandards (PS, PI, PC, PE, SM (Sigma)) in verschiedenen Konzentrationen (1 µg, 0,5 µg, 0,1 µg) mit aufgetragen.

Laufmittel LM 1:

266 ml Essigsäuremethylester
266 ml Propanol
266 ml Chloroform
106 ml Methanol
96 ml 0,25% KCl-Lösung

Laufmittel LM 2:

750 ml n-Hexan
230 ml Diethylether
20 ml Essigsäure

Laufmittel LM 3:

1 l n-Hexan

Färbelösung:

100 ml 85% H₃PO₄
75 g CuSO₄ x 5H₂O
900 ml H₂O

2.3.1.12.3 Phospholipidbestimmung nach Fiske-Subbarow

Die Gesamtkonzentration an Phospholipiden wurde durch eine Phosphoranalyse nach der Methode von Fiske-Subbarow bestimmt (Subbarow 1925).

Die extrahierten Lipide der Epididymosomen bzw. Spermien wurden in phosphatfreie Reaktionsgefäße überführt und in der Speed-Vac (Bachofer) getrocknet. Zu den getrockneten Lipiden wurde jeweils 0,7 ml 70%ige Perchlorsäure gegeben und die Probe bei 180 °C für 3 h inkubiert. Danach wurden die Proben für 15 min bei RT und anschließend für 5 min auf Eis abgekühlt. Hinterher wurden die Proben mit 2 ml 0,5%iger Ammoniummolybdatlösung und 100 µl Fiske-Subbarow Reagenz versetzt, gevortext und in einem Wasserbad (95 °C) erhitzt. Nach 10 min wurde die Reaktion auf Eis gestoppt und photometrisch bei $\lambda = 830 \text{ nm}$ gemessen (Subbarow 1925).

Mit Hilfe einer Standardkurve von Phenylphosphat-di-Natriumsalz konnte die Gesamtkonzentration von Phospholipiden in der Probe errechnet werden. Die Berechnung erfolgt nach der Gleichung:

$$\frac{E_P \cdot C_{\text{std}}}{E_{\text{std.}}} = C_P$$

E_P = Extinktion der Probe

$E_{\text{std.}}$ = Extinktion der Standardwerte

$C_{\text{std.}}$ = Konzentration der Standardwerte in mmol/l

C_P = Gesamtkonzentration an Phospholipiden in der Probe in mmol/l

Fiske-Subbarow Reagenz:

6,85 g Natriumdisulfit

0,5 g 1-Amino-2-Naphtalen-4-Sulfonsäure

ad. 40 ml dest. H_2O → 15 min rühren

Tropfenweise Zugabe von 1,5 g Natriumsulfatanhydrat in 5 ml dest. H_2O bis die Lösung klar ist.

Aufbewahrung im Dunkeln

2.3.1.13 Manuelle Cholesterolbestimmung nach Liebermann-Burchardt

Die Cholesterolkonzentration wurde nach der Liebermann-Burchardt-Methode bestimmt (Burke, et al. 1974). Zur Bestimmung des Cholesterolgehaltes in den Spermien bzw. Epididymosomen wurde als erstes eine Cholesterol-Reagenzlösung hergestellt, welche Essigsäure, Essigsäureanhydrid und Schwefelsäure beinhaltet. Cholesterol reagiert mit Essigsäure, Essigsäureanhydrid und Schwefelsäure in einer wasserfreien Umgebung unter Bildung von polymeren ungesättigten Kohlenwasserstoffen. Dies führt zu einer blaugrün Färbung der Lösung. Durch Zusatz von Toluol-4-Sulfonsäure in die Reagenzlösung werden die Eiweiße in der Probe zerstört. Somit ist keine Lipidextraktion nötig.

Für die Bestimmung des Cholesterolgehaltes wurden 50 µl Probe mit 2 ml Cholesterol-Reagenzlösung vermischt und bei 20 °C für 30 min inkubiert. Danach erfolgte die Messung bei $\lambda = 620$ nm in einer 1 cm Küvette gegen den Leerwert (50 µl Wasser + 2 ml Cholesterol-Reagenzlösung).

Mit Hilfe eines Cholesterolstandards (Sigma) wurde eine Standardkurve erstellt. Mit Hilfe dieser Standardkurve konnte der Gesamtcholesterol-Gehalt der Probe errechnet werden.

$$\frac{E_P \cdot C_{std}}{E_{std.}} = C_{chol}$$

E_p = Extinktion der Probe

$E_{std.}$ = Extinktion der Standardwerte

$C_{std.}$ = Konzentration der Standardwerte in mmol/l

C_{chol} = Konzentration des Gesamtcholesterol- Gehaltes in mmol/l

Cholesterol-Reagenzlösung bei 4 °C

90 ml Essigsäureanhydrid

45 ml Essigsäure

→ auf Eis rühren

1,5 g Toluol-4-Sulfonsäure

3 g Natriumsulfat, wasserfrei

Tropfenweise 15 ml Schwefelsäure dazugeben

2.3.2 Morphologische Methoden

2.3.2.1 Immunzytochemische Färbung an bovinen Spermatozoen

Die frisch gewonnenen bzw. fusionierten Spermien wurden 3mal in PBS gewaschen und jeweils bei 700x g für 5 min zentrifugiert. Davon wurden 5 µl Spermiesuspension pro Objektträger ausgestrichen und 2 h bei RT getrocknet. Die Objektträger mit den Ausstrichen wurden 10 min in PBS gewaschen und 15 min in 1% Triton-X 100 in PBS permeabilisiert. Anschließend wurden die unspezifischen Stellen für 30 min in 10% NGS („normal goat serum“- normales Ziegenserum) + 0,1% Triton-X 100 in PBS blockiert. Danach wurden die Objektträger in einer feuchten Kammer mit jeweils 200 µl Erstantikörperlösung (1. AK in Blockierungspuffer) (Tab. 3) bei 4°C über Nacht inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Objektträger 4mal für 15 min in PBS gewaschen. Die Objektträger wurden anschließend bei RT für 30 min in einer feuchten Kammer mit 200 µl Zweitantikörperlösung (2. AK in Blockierungspuffer) (Tab. 3) inkubiert. Um die nach der Fusion von Epididymosomen mit Spermien übertragenen biotinylierten Proteine zu detektieren, wurden diese Proteine mittels Streptavidin Alexa 488 in Blockierungspuffer immunzytochemisch dargestellt. Nach erneuten Waschgängen (4mal 10 min) wurde der Objektträger 15 min in 0,1 µg DAPI/ ml in PBS inkubiert und mit IMMU-MOUNT (Thermo Electron Corporation) eingedeckt.

Tab. 3: Verwendete Antikörper in der Immunfluoreszenz.

Primärer Antikörper:	Verdünnung:
α-PMCA (Klon 5F10, monoklonal) (ABR)	1:50
Sekundärer Antikörper:	
α -Mause Cy3 (Dinaova)	1:250
Primärer Antikörper:	
α-PMCA4 (Klon JA9, monoklonal) (ABR)	1:50
Sekundärer Antikörper:	
α-Mause Cy3 (Dianova)	1:250
Primärer Antikörper:	
α-PMCA4a (polyklonal) (Brandenburger et al. 2011)	1:25
Sekundärer Antikörper:	
α-Kaninchen Cy3 (Dianova)	1:250
Streptavidin Alexa 488 (Dianova)	1:1000

Blockierungspuffer:

10% NGS

0,1% Triton-X 100 in PBS

2.3.2.2 Transelektronenmikroskopie

Die Epididymosmen wurden wie unter Kapitel 2.3.1.1 (S. 25ff) gewonnen, für 3 h in Ito-Karnovsky-Fixans fixiert, 3mal 5 min in 0,1 M Cacodylatpuffer gewaschen.

Da sich Wasser und Kunstharz nicht mischen lassen, musste die Probe vor der Einbettung stufenweise entwässert werden. Dafür diente eine Ethanolreihe (50% - 70% - 90% - 96%, Isopropanol 100%). Für die anschließende Kunstharzinfiltration wurde die Probe 2mal 10 min im Propylenoxid-Zwischenmedium inkubiert. Da aus Viskositätsgründen die Kunstharzinfiltration stufenweise erfolgen soll, begann die Infiltration über Nacht mit Propylenoxid/Epoxidharz-Gemisch (1:1) und erst darauffolgend eine Infiltration mit Epon C über Nacht. Nach der Einbettung in Gelatine kapseln mit frischem, entgastem Epon 812-Gemisch erfolgte die Polymerisation bei 60 °C für 24 h. Ultradünnschnitte (100 nm) wurden mit einem Ultracut S angefertigt. Nach Übertragung auf Kupfernetze werden die Schnitte mit Uranylacetat und Bleicitrat für 5 min kontrastiert und luftgetrocknet. Die elektronenmikroskopische Analyse erfolgte mit einem Zeiss EM10.

Fixierlösung nach Ito & Karnovsky (1968):

2,5 % Paraformaldehyd

2,5 % Glutaraldehyd

0,05 % Pikrinsäure

100 mM Cacodilat; pH 7,3

Cacodylatpuffer :

0,1 M Na-Cacodylat; pH 7,3

2.3.3 Statistische Auswertung

Für die Statistische Auswertung wurde die Varianzanalysenform ANOVA (univariate Varianzanalyse) verwendet. Die Angaben von $p < 0,05$ bezeichnen eine signifikante Veränderung.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung boviner Epididymosomen

3.1.1 Morphologie boviner Epididymosomen

Die Nebenhodenvesikel wurden durch mehrere Zentrifugationsschritte und über eine Gelfiltrationschromatographie aus dem Nebenhoden gewonnen. Die isolierten Vesikel aus dem Caput und Cauda Segment des Nebenhodens wurden mittels Transelektronenmikroskopie auf ihre Reinheit untersucht und morphologisch charakterisiert.

Bei morphologischer Betrachtung der bovinen Nebenhodenvesikel zeigten sich Unterschiede zwischen Vesikeln aus dem Caput Segment und Vesikeln aus dem Cauda Segment des Nebenhodens. Nebenhodenvesikel aus dem Caput Segment waren im Durchschnitt kleiner (90 - 450 nm) als Nebenhodenvesikel des Cauda Segmentes (150 - 750 nm) (Abb. 12). Desweiteren war in den elektronenmikroskopischen Aufnahmen innerhalb der kleinen Epididymosomen aus dem Caput und Cauda Segment eine erhöhte Ansammlung von Partikeln zu sehen. Sowohl in den Caput als auch in den Cauda Epididymosomen wurden keine Organellen gefunden (Abb. 12).

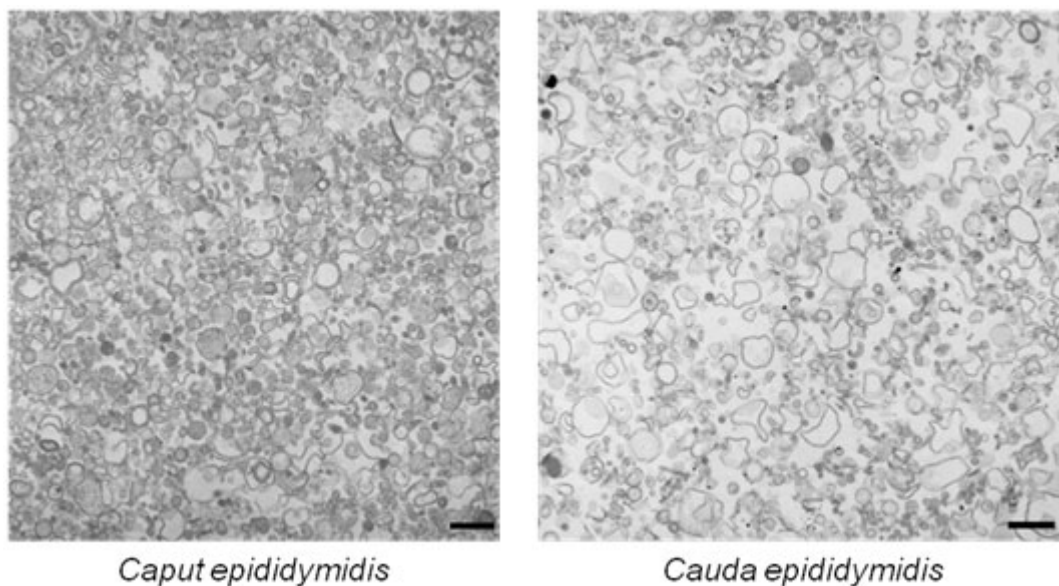


Abb. 12: Ultrastrukturelle Analyse von Epididymosomen des *Caput epididymidis* und der *Cauda epididymidis*. Die Größe der Nebenhodenvesikel aus dem Caput Segment beträgt 90 - 450 nm und aus dem Cauda Segment 150 - 750 nm. Balken = 0,73 μ m.

Biochemische und elektronenmikroskopische Untersuchungen an der Koagulationsdrüse hatten gezeigt, dass klassische zytoplasmatische Proteine wie die Laktatdehydrogenase (LDH) weder im Sekret noch in Aposomen nachzuweisen sind. LDH wird demnach nicht in die Aposomen transloziert, sondern verbleibt im Zytoplasma (Wilhelm et al. 1998). MIF wurde in vorherigen Untersuchungen in Vesikeln des Nebenhodens als apokrin sekretiertes Protein der Nebenhoden-Epithelzellen identifiziert (Eickhoff et al. 2001). Um nun zu belegen, dass es sich bei den hier gewonnenen Epididymosomen um apokrin sezernierte Vesikel und nicht um Zellfragmente handelte, wurde im Westernblot überprüft, ob in den isolierten Vesikeln LDH (36 kDa) und MIF (12 kDa Monomer, 24 kDa Dimer) nachzuweisen war (Abb. 13, 14). Die Ergebnisse belegen, dass sowohl in Epididymosomen des *Caput*- und der *Cauda epididymidis* eindeutig apokrin sekretiertes MIF Protein enthalten war (Abb. 13). Desweiteren konnte das zytoplasmatische Protein LDH im Vergleich zu den Positivkontrollen (Nebenhodengewebe, Zytosol) in den Vesikeln nicht nachgewiesen werden (Abb. 14).

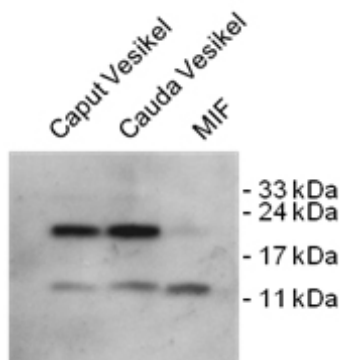


Abb. 13: Westernblot-Analyse (12%iges Gel; Invitrogen) unter Verwendung eines Antikörpers gegen MIF an Nebenhodenvesikeln (15 µg) des *Caput epididymidis* und der *Cauda epididymidis*. Rekombinantes MIF (2 µg) wurde als Positivkontrolle aufgetragen.

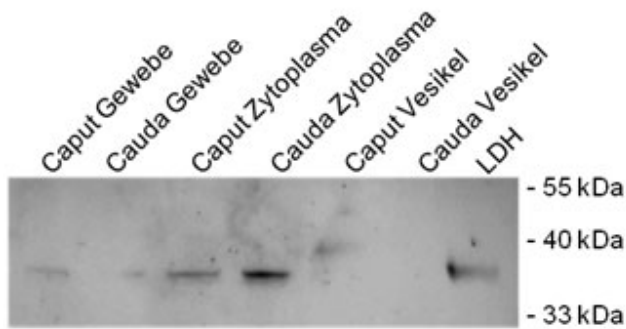


Abb. 14: Westernblot-Analyse (12%iges Gel; Invitrogen) unter Verwendung eines Antikörpers gegen LDH an Nebenhodenvesikeln (30 µg) des *Caput epididymidis* und der *Cauda epididymidis*. Rekombinantes LDH (0,5 µg), Proben aus dem bovinen Nebenhodengewebe (30 µg) und dem bovinen Nebenhodenzcytoplasma (30 µg) wurden als Positivkontrolle aufgetragen.

3.1.2 Lipidzusammensetzung boviner Epididymosomen

Die Epididymosomen des Caput- und Cauda Segmentes wurden hinsichtlich ihrer Lipidzusammensetzung untersucht. Im Verlauf von *Caput* zur *Cauda epididymidis* konnten Unterschiede in der Lipidzusammensetzung der bovinen Epididymosomen festgestellt werden. Die Lipidanalysen von Caput und Cauda Epididymosomen belegten, dass sowohl die Cholesterol- als auch die Phospholipidkonzentration signifikant von Caput zu Cauda abnahm (Tab. 4, Abb. 15). Das Verhältnis von Cholesterol zu Phospholipiden stieg dabei leicht an (Tab. 4).

Tab. 4: Lipidzusammensetzung boviner Epididymosomen.

	Gesamtkonzentration nM/ mg Protein		Chol/P-Verhältnis
	Cholesterol	Phospholipide	
Caput Epididymosomen	600,75 ± 103,98	781,40 ± 66,77	0,77
Cauda Epididymosomen	455,29 ± 125,14*	525,20 ± 51,06*	0,87
Abnahme %	25	30	

Mittelwert ± Standardabweichung; signifikante Veränderung (*) $p < 0,05$ (N= 8)

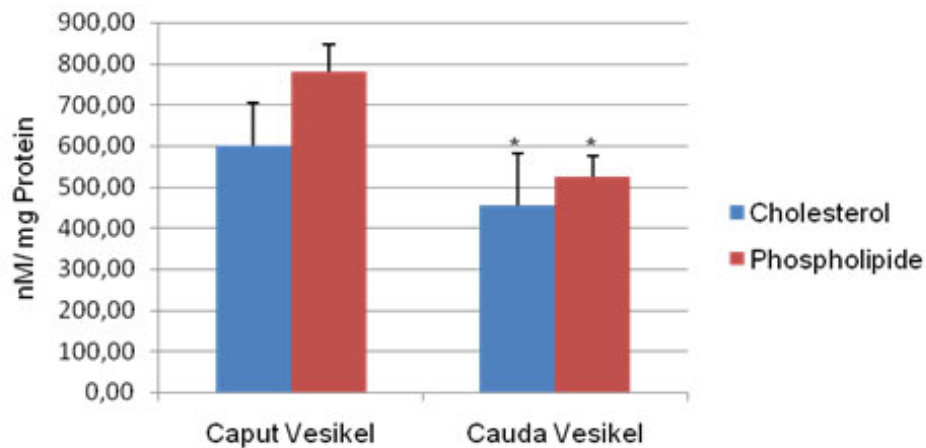


Abb.15: Lipidzusammensetzung boviner Epididymosomen. Vertikale Balken stellen die Standardabweichung dar; signifikante Veränderung im Verlauf des Nebenhodentraktes (*); $p < 0,05$; (N= 8)

Eine detaillierte Analyse der Phospholipide zeigte ein breites Phospholipidspektrum boviner Epididymosomen. Den Hauptanteil der Phospholipide bildeten Phosphatidylethanolamin (PE), Phosphatidylcholin (PC) und Sphingomyelin (SM) (Abb. 16, 17; Tab. 5). Phosphatidylserin (PS) und Phosphatidylinositol (PI) nahmen nur einen geringen Anteil an den Gesamtphospholipiden ein. Es konnte eine Abnahme sämtlicher Phospholipide vom Caput- zum Cauda Segment gemessen werden. Die Änderungen waren nicht signifikant.

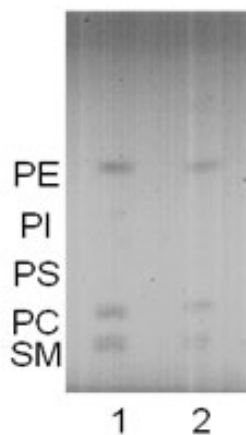


Abb. 16: Dünnschichtchromatographische Auftrennung extrahierter Lipide boviner Epididymosomen des Caput- (1) und des Cauda Segmentes (2). PE - Phosphatidylethanolamin; PI - Phosphatidylinositol; PS - Phosphatidylserin; PC - Phosphatidylcholin; SM - Sphingomyelin.

Tab. 5: Densitometrische Auswertung (Scion Image) der durch Dünnschichtchromatographie getrennten Phospholipide boviner Epididymosomen aus dem Caput- und dem Cauda Segment.

Epididymosomen	PE $\mu\text{g}/\text{mg}$ Protein	PI $\mu\text{g}/\text{mg}$ Protein	PS $\mu\text{g}/\text{mg}$ Protein	PC $\mu\text{g}/\text{mg}$ Protein	SM $\mu\text{g}/\text{mg}$ Protein
Caput epididymidis	$3,78 \pm 0,72$	$1,46 \pm 1,55$	$2,87 \pm 1,30$	$5,11 \pm 1,73$	$5,76 \pm 1,77$
Cauda epididymidis	$3,35 \pm 1,35$	$0,51 \pm 0,49$	$2,12 \pm 1,67$	$3,95 \pm 1,69$	$4,44 \pm 2,37$

Mittelwert \pm Standardabweichung; (N= 5)

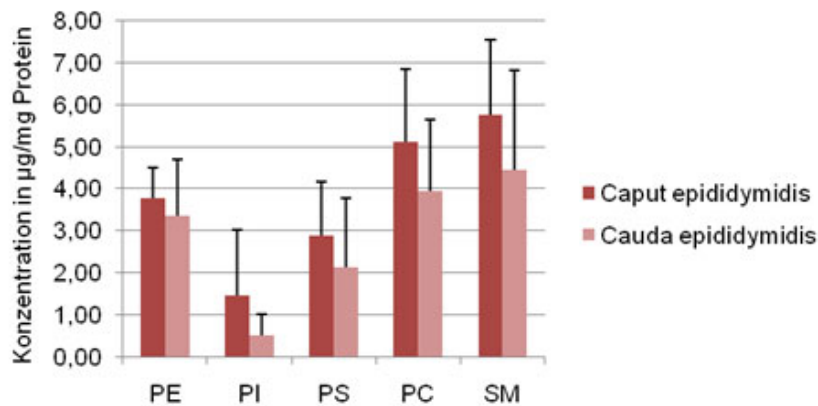


Abb. 17: Densitometrische Auswertung der durch Dünnschichtchromatographie aufgetrennten Phospholipide boviner Epididymosomen des Caput- und des Cauda Segmentes. PE - Phosphatidylethanolamin, PI - Phosphatidylinositol; PS - Phosphatidylserin, PC - Phosphatidylcholin; SM – Sphingomyelin; Standardabweichung dargestellt durch vertikale Balken. (N= 5)

3.1.3 Nachweis von PMCA, PMCA4 und PMCA4a in bovinen Epididymosomen

Zunächst wurde im SDS-Gel untersucht, ob sich das Proteinspektrum der Caput und Cauda Epididymosomen unterscheidet. Mittels Coomassie-Blau-Färbung der SDS-Gel-Banden von Caput und Cauda Epididymosomen konnte ein unterschiedliches Bandenspektrum dokumentiert werden (Abb. 18). Besonders starke Unterschiede zeigten sich im Bereich von 100 – 130 kDa. Hier waren bei Cauda Epididymosomen deutlichere Banden erkennbar (siehe Abb. 18*), wohingegen diese in Caput Epididymosomen fehlen oder weniger stark ausgeprägt waren. Die Caput Epididymosomen zeigten hingegen ein intensiveres Bandenspektrum im Bereich von 72 – 100 kDa.

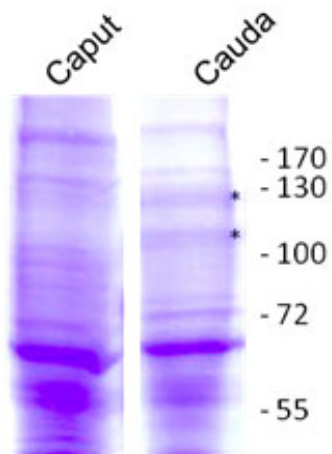


Abb. 18: Auftrennung der Proteine von Caput und Cauda Epididymosomen im SDS-Gel (7,5%) und Färbung der Proteine mit Coomassie-Blau. *Unterschiede im Bandenspektrum der Cauda Epididymosomen zu Caput Epididymosomen; Auftragsvolumen: 30 µg Protein.

Mittels Westernblot-Analysen an bovinen Nebenhodenvesikeln des Caput- und des Cauda Segmentes konnte PMCA, PMCA4 und deren Spleißvariante PMCA4a nachgewiesen werden (Abb. 19).

Der monoklonale Antikörper α -PMCA (Klon 5F10) ist kreuzreaktiv gegen die PMCA-Isoformen 1 - 4 (Borke, et al. 1989). In Abb. 19 (Spur 2) ist eine stärkere Bande um 130 kDa und schwächere Banden unterhalb von 130 kDa in Cauda Epididymosomen sichtbar. In Caput Epididymosomen detektiert der Antikörper gegen PMCA zwei stärkerer Banden oberhalb und unterhalb von 130 kDa (Abb. 19, Spur 1).

Der PMCA Isoform 4 Antikörper (Klon JA9) detektiert die Spleißvarianten PMCA4a (129 kDa) und PMCA4b (133 kDa) (Caride et al. 1996). In bovinen Nebenhodenvesikeln des Caput Segmentes konnte eine stärkere Bande oberhalb von 130 kDa detektiert werden, als auch schwächere Banden darunter. In bovinen Nebenhodenvesikeln des Cauda Segmentes konnte eine starke Bande etwa auf der Höhe von 130 kDa nachgewiesen werden, als auch eine schwächere Bande unterhalb von 130 kDa (Abb. 19).

Darüberhinaus wurde ein polyklonaler Antikörper gegen PMCA4a verwendet (Brandenburger et al. 2011). PMCA4a mit einer Größe von 129 kDa war in beiden Epididymosomen unterschiedlich stark nachzuweisen (Abb. 19). Dabei wurde deutlich, dass in Epididymosomen des *Caput epididymidis* weniger

PMCA4a nachweisbar war, als in Epididymosomen der *Cauda epididymidis* (Abb. 19). Dies steht im Einklang mit dem PMCA4 Blot.

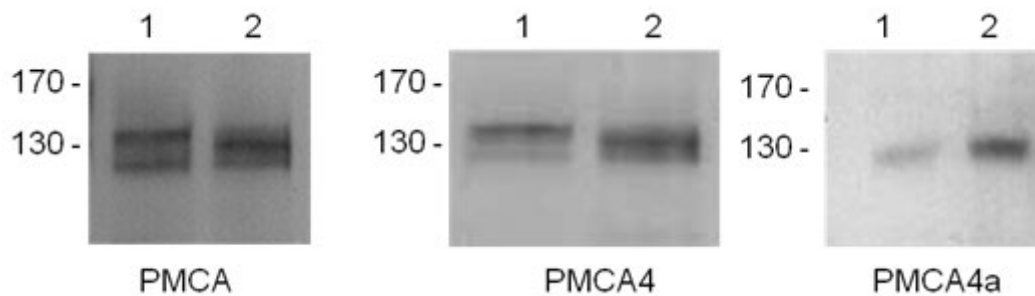


Abb. 19: Westernblot-Analyse (7,5%iges Gel) von PMCA, PMCA4 und PMCA4a an Nebenhodenvesikeln (15 µg) des *Caput epididymidis* (Spur: 1) und der *Cauda epididymidis* (Spur: 2) N= 3.

3.1.4 Ca^{2+} -ATPase-Aktivität boviner Epididymosomen

Über Westernblot-Analyse konnte PMCA, PMCA4 und PMCA4a in den Epididymosomen detektiert werden (Abb. 19). Daraufhin sollte nun die Ca^{2+} -ATPase-Aktivität in bovinen Epididymosomen bestimmt werden. Außerdem sollte festgestellt werden, ob sich die Aktivität zwischen Caput und Cauda Epididymosomen unterscheidet. Anhand einer KH_2PO_4 -Standardkurve wurde das freigesetzte P_i als $\mu\text{mol P}_i/\text{mg Protein}/\text{h}$ aus den gemessenen Extinktionswerten_{820 nm} errechnet.

Sowohl die Mg^{2+} -abhängige als auch die Mg^{2+} -unabhängige Ca^{2+} -ATPase-Aktivität stieg von Caput zu Cauda Epididymosomen signifikant an. Dabei nahm die Mg^{2+} -abhängige Ca^{2+} -ATPase-Aktivität signifikant um 153% und die Mg^{2+} -unabhängige Ca^{2+} -ATPase-Aktivität signifikant um 139% zu (Abb. 20, Tab. 6).

In vorausgehenden Untersuchungen wurde gezeigt, dass das sekretorische Protein PDC-109 einen stimulierenden Einfluss auf die Ca^{2+} -ATPase-Aktivität in bovinen Spermien hat (Sanchez-Luengo et al. 2004; Triphan et al. 2007). Deshalb sollte überprüft werden, ob auch die Ca^{2+} -ATPase-Aktivität der Nebenhodenvesikel durch PDC-109 beeinflusst wird. Hierbei zeigte sich, dass es durch Zugabe von PDC-109 zu einer Aktivitätserhöhung der Ca^{2+} -ATPase in bovinen Epididymosomen des Caput- und des Cauda Segmentes kam (Abb.

20, Tab. 6). Die Ca^{2+} -ATPase-Aktivität in Epididymosomen aus dem Nebenhodenkopf wurde stärker stimuliert als die ATPase aus den Epididymosomen des Nebenhodenschwanzes (Abb. 20; Tab. 6). Dabei stieg die Mg^{2+} -abhängige Ca^{2+} -ATPase-Aktivität nach Zugabe von PDC-109 in Caput Epididymosomen um 260% und in Cauda Epididymosomen um 100% an. Die Mg^{2+} -unabhängige Ca^{2+} -ATPase-Aktivität wurde nach Zugabe von PDC-109 in den Caput Epididymosomen um 180% und in den Cauda Epididymosomen um 58% erhöht.

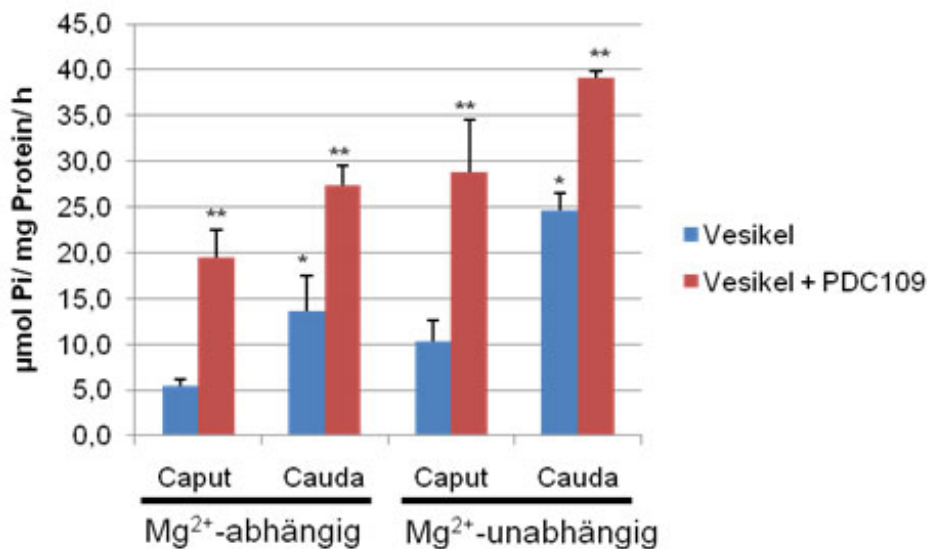


Abb. 20: Mg^{2+} -abhängige und -unabhängige Ca^{2+} -ATPase-Aktivität boviner Nebenhodenvesikel mit und ohne Zugabe von 20 μg PDC-109. Die Mg^{2+} -abhängige und -unabhängige Ca^{2+} -ATPase-Aktivität änderte sich signifikant von Caput zu Cauda (*). Außerdem kam es zu einem signifikanten Anstieg der ATPase-Aktivität durch Zugabe von PDC-109 (**). Standardabweichung gekennzeichnet durch vertikalen Balken; $p < 0,05$ (N= 5)

Tab. 6: Mg^{2+} -abhängige und -unabhängige Ca^{2+} -ATPase-Aktivität boviner Nebenhodenvesikel.

Epididymosomen	Mg^{2+} -abhängig		Mg^{2+} -unabhängig	
	Caput epididymidis	Cauda epididymidis	Caput epididymidis	Cauda epididymidis
Ca^{2+} -ATPase-Aktivität in $\mu\text{mol Pi / mg Protein / h}$	$5,4 \pm 0,7$	$13,7 \pm 3,8^*$	$10,3 \pm 2,4$	$24,7 \pm 1,9^\#$
Ca^{2+} -ATPase-Aktivität mit PDC-109 (20 μg) in $\mu\text{mol Pi / mg Protein / h}$	$19,4 \pm 3,1^{**}$	$27,4 \pm 2,1^{**}$	$28,8 \pm 5,8^{##}$	$39,1 \pm 0,8^{##}$

Signifikante Veränderung von Caput zu Cauda(*, #). Signifikante Veränderung nach Zugabe von PDC-109 (**, ##). Mittelwert \pm Standardabweichung, $p < 0,05$ (N= 5)

3.2 *In vitro* Fusion boviner Nebenhodenspermien mit Epididymosomen

Mittels *in vitro* Fusion boviner Spermatozoen mit Epididymosomen sollte festgestellt werden, ob funktionelle und morphologische Veränderungen an den Spermatozoen durch Fusion mit Epididymosomen stattfinden.

3.2.1 Übertragung von Octadecylrhodamin B nach *in vitro* Fusion

Zunächst wurde untersucht, ob Epididymosomen generell mit Nebenhodenspermien fusionieren. Dazu wurden die Epididymosomen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Octadecylrhodamin B (R18) markiert. Die Fusion ließ sich über ein Delta Scan Illuminationssystem messen, da bei der Fusion aus den in der Membran eingebauten R18-Dimeren stärker fluoreszierende Monomere entstehen. Es wurde die Fusion von Spermien aus dem Nebenhodenkopf mit Epididymosomen aus dem Nebenhodenkopf und dem Nebenhodenschwanz untersucht. Desweiteren wurden auch Spermien aus dem Nebenhodenschwanz mit Epididymosomen aus dem Nebenhodenkopf und Nebenhodenschwanz analysiert. Außerdem wurde die Fusion in Abhängigkeit von der Zeit und dem pH-Wert untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass sich die Interaktion der Epididymosomen mit den heranreifenden Spermatozoen in den unterschiedlichen Bereichen des Nebenhodens, als auch in Abhängigkeit von der Zeit und dem pH-Wert unterschied (Abb. 21 - 24).

Für die Untersuchung der *in vitro* Fusion in Abhängigkeit vom pH-Wert, wurden verschiedene Fusionspuffer eingesetzt (pH 5; pH 7 und pH 8). Dabei ließ sich beobachten, dass die Fähigkeit zur *in vitro* Fusion zwischen Nebenhodenvesikeln und Spermatozoen mit steigendem pH-Wert sank.

Bei pH 5,0 zeigte sich ein kontinuierlicher Anstieg der Fluoreszenz mit der Zeit (Abb. 21). Die Versuche belegten eindeutig, dass es nach 10 min zu einer Sättigung des Fusionsereignisses kam. Die Sättigung wurde bei der Fusion von Caputspermien mit Caputvesikeln bei 35%, von Caputspermien mit Caudavesikeln bei 36%, von Caudaspermien mit Caudavesikeln bei 22% und

von Caudaspermien mit Caputvesikeln bei 28% erreicht (Abb. 24). Dies zeigt, dass bovine Spermatozoen aus dem Cauda Segment eine geringere Fusionsbereitschaft besaßen, gegenüber Spermatozoen aus dem Caput Segment des Nebenhodens (Abb. 21; 24). Hingegen ließ sich bei einem neutralen pH-Wert von sieben ein geringes und bei einem basischen pH von acht fast kein Fluoreszenzanstieg an bovinen Spermatozoen messen (Abb. 22, 23, 24).

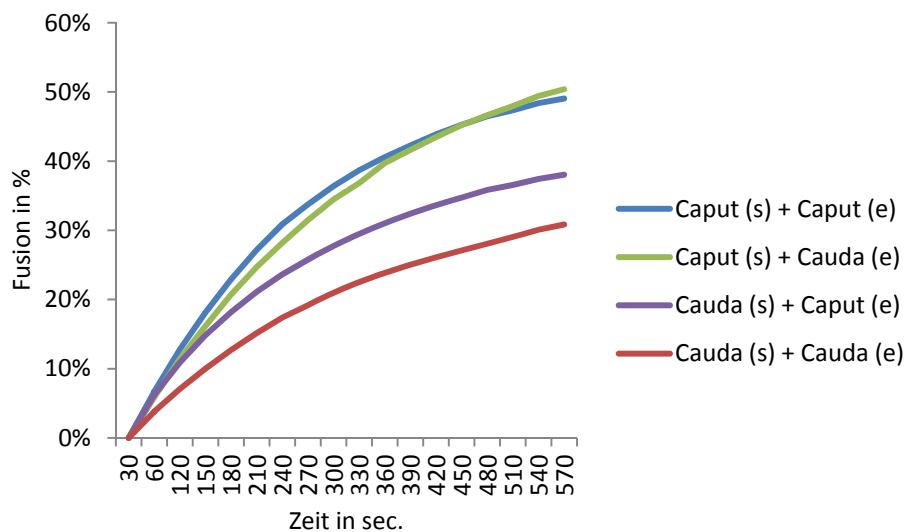


Abb. 21: *In vitro* Fusion boviner Nebenhodenspermien (s) bei pH= 5,0 mit R18 markierten Epididymosomen (e) in Abhängigkeit von der Zeit (570 sec.). Die Fusion wurde mit dem Puffer 0,32 mol/L Sucrose mit 20 mmol/L MES durchgeführt. Die prozentuale Fluoreszenz berechnete sich für jede Spermien/Vesikel-Kombination aus jeweils 4 unabhängig durchgeführten Messungen (n= 4). Die prozentuale Fusion wurde aus der prozentualen Fluoreszenz mit der Formel $F = FI \times (I + r)/I$ nach Corazzi et al. (1991) abgeleitet. Im Anhang ist exemplarisch eine Messung für jede Spermien/Vesikel-Kombination (Abb. 44), sowie die Berechnung der prozentualen Fusion aus der prozentualen Fluoreszenz (Tab. 10) dargestellt.

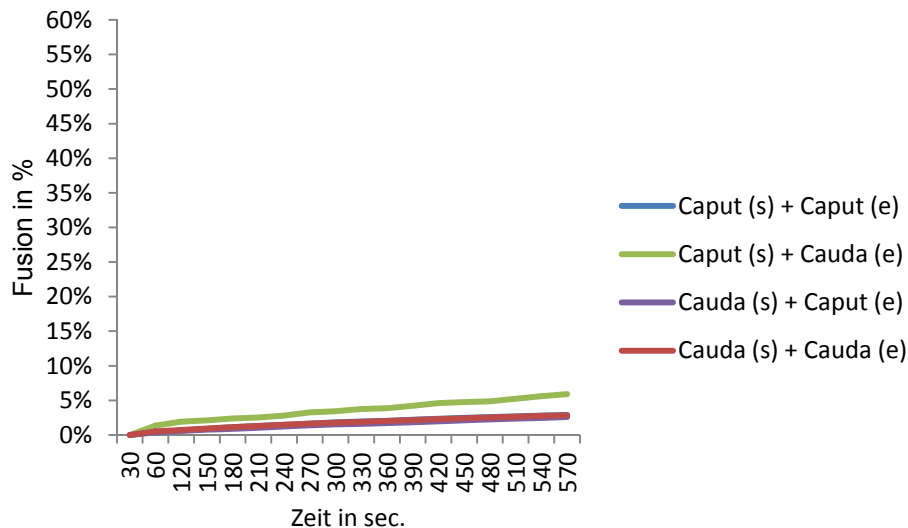


Abb. 22: *In vitro* Fusion boviner Nebenhodenspermien (s) bei pH= 7,0 mit R18 markierten Epididymosomen (e) in Abhängigkeit von der Zeit (570 sec.). Die Fusion wurde mit dem Puffer 0,32 mol/L Sucrose mit 2 mmol/L HEPES durchgeführt. Die prozentuale Fluoreszenz berechnete sich für jede Spermien/Vesikel-Kombination aus jeweils 4 unabhängig durchgeführten Messungen (n= 4). Die prozentuale Fusion wurde aus der prozentualen Fluoreszenz mit der Formel $F = FI \times (I + r)/I$ nach Corazzi et al. (1991) abgeleitet. Im Anhang ist exemplarisch eine Messung für jede Spermien/Vesikel-Kombination (Abb. 45), sowie die Berechnung der prozentualen Fusion aus der prozentualen Fluoreszenz (Tab. 11) dargestellt.

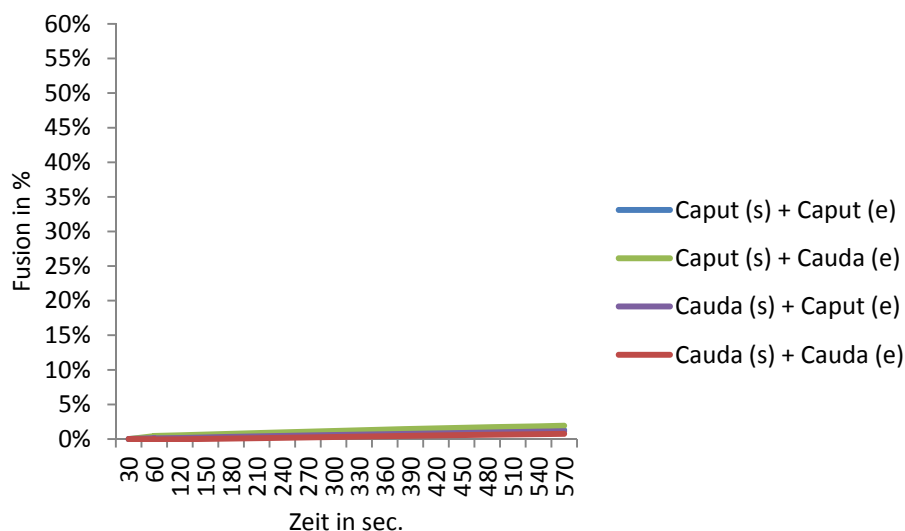


Abb. 23: *In vitro* Fusion boviner Nebenhodenspermien (s) bei pH= 8,0 mit R18 markierten Epididymosomen (e) in Abhängigkeit von der Zeit (570 sec.). Die Fusion wurde mit dem Puffer 0,32 mol/L Sucrose mit 2 mmol/L HEPES durchgeführt. Die prozentuale Fluoreszenz berechnete sich für jede Spermien/Vesikel-Kombination aus jeweils 4 unabhängig durchgeführten Messungen (n= 4). Die prozentuale Fusion wurde aus der prozentualen Fluoreszenz mit der Formel $F = FI \times (I + r)/I$ nach Corazzi et al. (1991) abgeleitet. Im Anhang ist exemplarisch eine Messung für jede Spermien/Vesikel-Kombination (Abb. 46), sowie die Berechnung der prozentualen Fusion aus der prozentualen Fluoreszenz (Tab. 12) dargestellt.

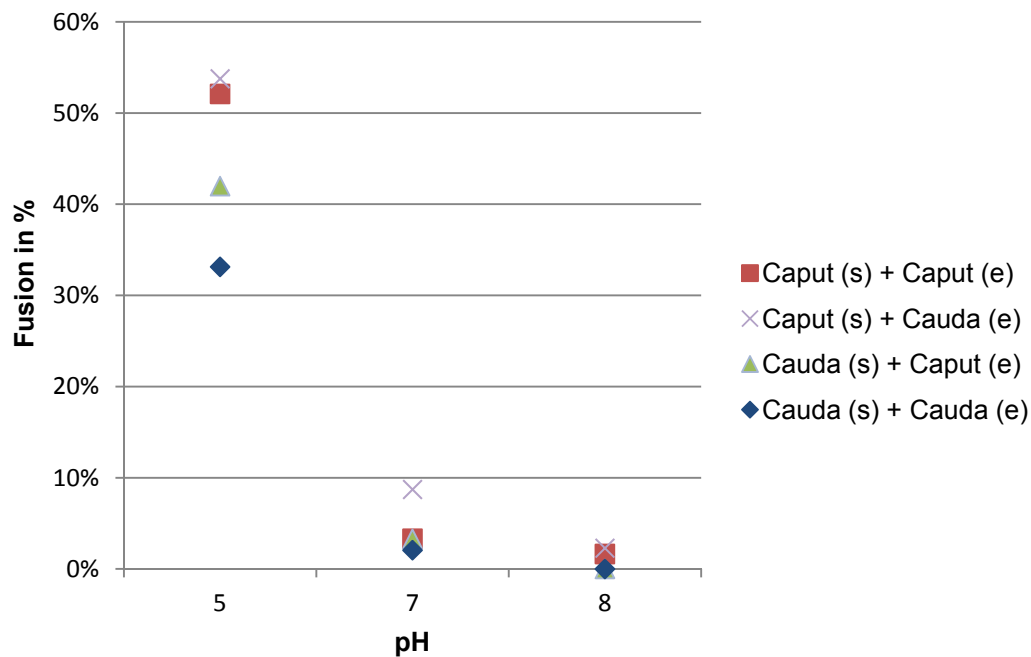


Abb. 24: *In vitro* Fusion boviner Nebenhodenspermien (s) mit R18 markierten Epididymosomen (e) in Abhängigkeit vom pH-Wert nach 10 min. Die Fusion wurde in einem Puffer mit 0.32 mol/L Sucrose in 20 mmol/L MES (pH 5) oder 2 mmol/L HEPES (pH 7 und pH 8) durchgeführt. Die prozentuale Fluoreszenz berechnete sich für jede Spermien/Vesikel-Kombination aus jeweils 4 unabhängig durchgeführten Messungen (n= 4). Die prozentuale Fusion wurde aus der prozentualen Fluoreszenz mit der Formel $F = FI \times (I + r)/I$ nach Corazzi et al. (1991) abgeleitet.

Der Transfer von Membranbestandteilen der Epididymosomen auf bovine Spermien wurde weiterhin im Fluoreszenzmikroskop untersucht. Mittels dieser mikroskopischen Analyse konnte nach *in vitro* Fusion der Spermien mit R18 markierten Epididymosomen bestätigt werden, dass die *in vitro* Fusion in Abhängigkeit vom pH-Wert verläuft (Abb. 25). Bei pH 5,0 fand ein Transfer von Membranbestandteilen bei jeder Spermien/Vesikel-Kombination (Caput, Cauda) statt (Abb. 21, 25). Die erhöhte Fluoreszenz konnte vermehrt am Hals- und Mittelstück bis über den gesamten Schwanzbereich, sowie im gesamten Kopfbereich der Nebenhodenspermien detektiert werden. Die mikroskopischen Untersuchungen wurde durch pH 6,5 erweitert, da dieser pH dem physiologischen Wert des bovinen Nebenhodens entspricht. Bei pH-Wert 6,5 fand ein Anstieg der Fluoreszenzintensität im Kopfbereich, sowie im Hals- und Mittelstück des Spermischwanzes statt. Nach der *in vitro* Fusion von Caputspermien mit Caput Epididymosomen bei pH 6,5 konnte eine erhöhte Fluoreszenz über den gesamten Schwanzbereich nachgewiesen werden. Keine Fluoreszenzintensitätserhöhung konnte bei der Spermien/Vesikel-Kombination Cauda/Caput detektiert werden (Abb. 25). Im neutralen (pH 7,0) und basischen

Bereich (pH 8,0) war bei keiner Spermien/Vesikel-Kombination ein Anstieg der Fluoreszenzintensität nach *in vitro* Fusion erkennbar (Abb. 25).

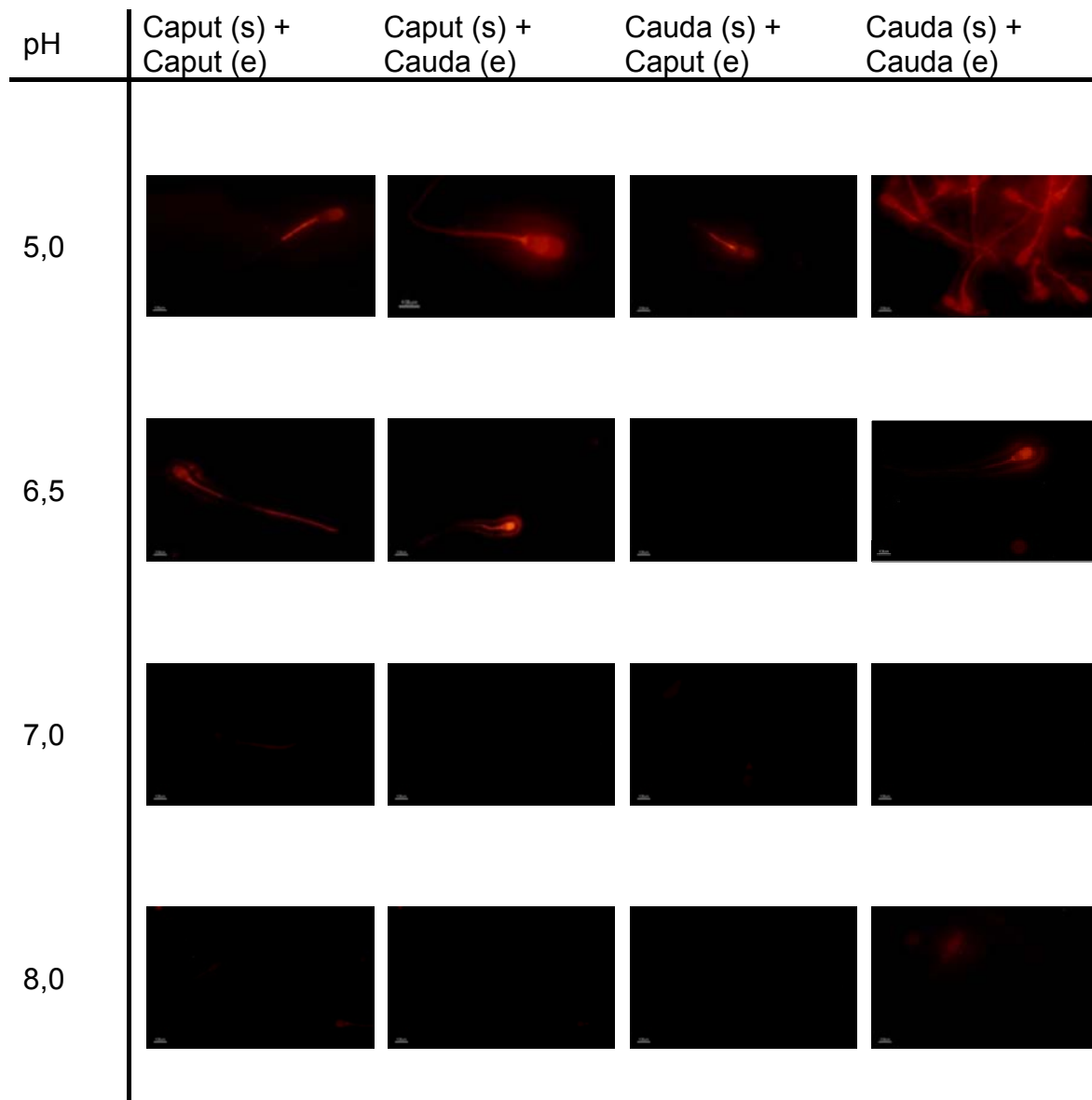


Abb. 25: Transfer von Membranbestandteilen von R18 markierten Epididymosomen (e) auf Bullenspermien (s) durch *in vitro* Fusion in Abhängigkeit vom pH-Wert nach 10 min. Die *in vitro* Fusion wurde im Puffer mit 0,32 mol/L Sucrose in 20 mmol/L MES (pH 5,0; pH 6,5) oder 2 mmol/L HEPES (pH 7,0; pH 8,0) durchgeführt. Emission λ = 580 nm. N= 3; Balken= 6 μ m

Obwohl es bei pH 5,0 deutlichere Fusionssignale als bei pH 6,5 gab, wurden die folgenden Untersuchungen bei einem pH-Wert von 6,5 durchgeführt, da dieser dem physiologischem pH-Wert des bovinen Nebenhodens entspricht (Levine & Marsh 1971).

3.2.2 Lipidzusammensetzung boviner Spermatozoen vor und nach *in vitro* Fusion mit Epididymosomen

In folgenden Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass die Cholesterolkonzentration in Spermien isoliert aus dem Nebenhodenkopf hin zu Spermien isoliert aus dem Nebenhodenschwanz um 26% abnahm (Abb. 26), wobei die Phospholipidkonzentration relativ konstant blieb (Abb. 27). Dadurch kam es zu einer Abnahme des Cholesterol/ Phospholipid-Verhältnisses der Nebenhodenspermien (Tab. 7).

Durch *in vitro* Fusion boviner Spermatozoen des *Caput epididymidis* mit Epididymosomen (Caput, Cauda) kam es zu einer Verminderung des Cholesterol/ Phospholipid-Verhältnisses in den Spermien (Tab. 7). Dies resultierte aus der Erhöhung der Phospholipidkonzentration der Spermatozoen des *Caput epididymidis* nach *in vitro* Fusion mit Caput Epididymosomen um 23% und Cauda Epididymosomen um 17% (Abb. 27). Die Cholesterolkonzentration blieb dabei konstant. Die Spermatozoen der *Cauda epididymidis* wiesen nach *in vitro* Fusion hingegen eine erhöhte Cholesterolkonzentration und eine erhöhte Phospholipidkonzentration auf (Abb. 26, 27). Gleichzeitig blieb das Cholesterol/ Phospholipid-Verhältnis der Cauda Spermatozoen vor und nach *in vitro* Fusion konstant (Tab. 7).

Tab.7: Cholesterol- und Phospholipidkonzentration boviner Nebenhodenspermien vor und nach *in vitro* Fusion mit Caput bzw. Cauda Vesikeln.

	Gesamtkonzentration in nM/ 10 ⁷ Spermien		Chol/P-Verhältnis
	Cholesterin	Phospholipide	
Caputspermien	26,60 ± 3,30	24,20 ± 0,72	1,1
+ Caput Vesikel	26,69 ± 1,63	31,12 ± 4,59*	0,9
+ Cauda Vesikel	24,24 ± 2,98	29,38 ± 2,81*	0,8
Caudaspermien	19,78 ± 2,53*	25,73 ± 0,90	0,8
+ Caput Vesikel	23,66 ± 2,63**	34,26 ± 5,30**	0,7
+ Cauda Vesikel	23,34 ± 1,63**	27,88 ± 2,71	0,8

	Gesamtkonzentration nM/ mg Protein		Chol/P-Verhältnis
	Cholesterol	Phospholipide	
Caput Epididymosomen	600,75 ± 103,98	781,40 ± 66,77	0,77
Cauda Epididymosomen	455,29 ± 125,14*	525,20 ± 51,06*	0,87

Die Messung erfolgte an 10⁷ Spermatozoen. Mittelwert ± Standardabweichung; signifikante Veränderung zu den Caputspermien (*) oder Caudaspermien (**); p < 0,05 (N= 7).

Für den Gesamteindruck der Lipidkonzentrationen wurde die Messung der Epididymosomen in einer extra Tabelle mit aufgeführt.

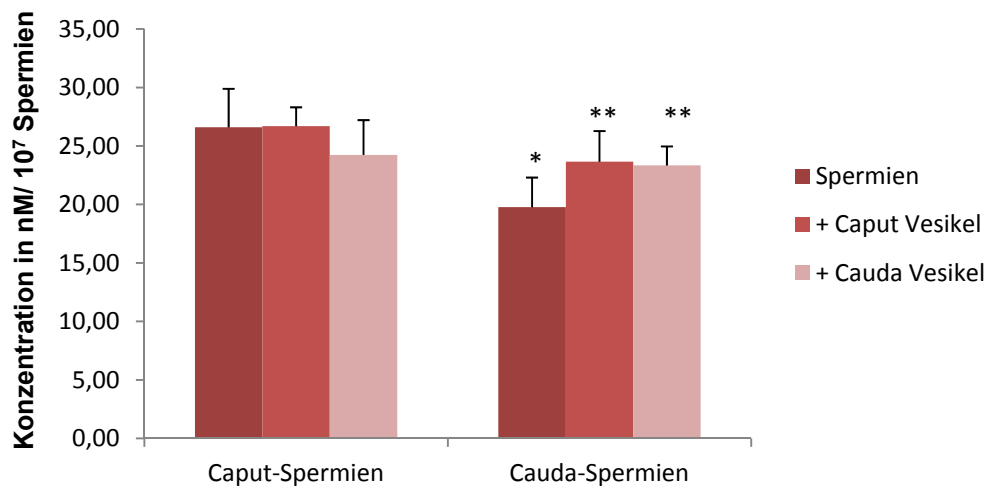


Abb. 26: Cholesterolkonzentration boviner Nebenhodenspermien (Caput, Cauda) vor und nach *in vitro* Fusion mit Caput bzw. Cauda Vesikeln. Die Messung erfolgte an 10⁷ Spermatozoen. Vertikale Balken kennzeichnen die Standardabweichung; signifikante Veränderung zu den Caputspermien (*) oder Caudaspermien (**); p < 0,05 (N= 7)

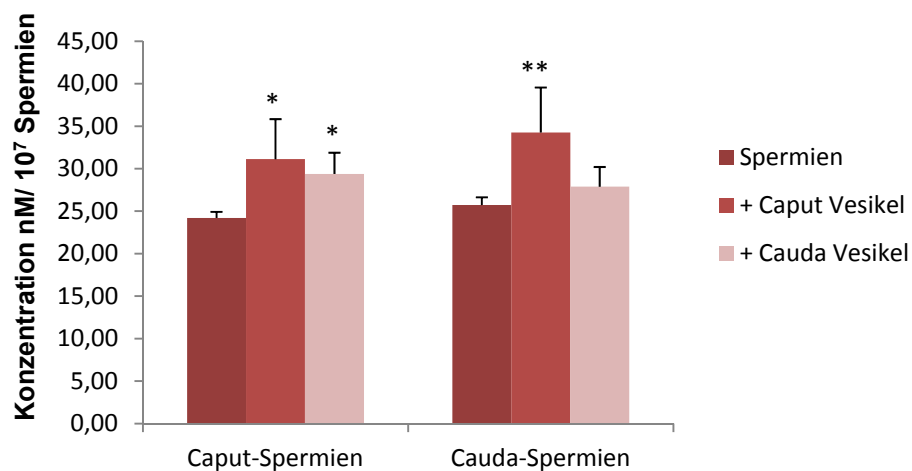


Abb. 27: Phospholipidkonzentration boviner Nebenhodenspermien (Caput, Cauda) vor und nach *in vitro* Fusion mit Caput bzw. Cauda Vesikeln. Die Messung erfolgte an 10^7 Spermatozoen. Vertikale Balken kennzeichnen die Standardabweichung; signifikante Veränderung zu den Caputspermien (*) oder Caudaspermien (**); $p < 0,05$ (N= 7)

Mittels Dünnschichtchromatographie wurden die Phospholipide detailliert analysiert und densitometrisch ausgewertet (Scion Image) (Abb. 28). Die Untersuchungen wurden an Spermien vor und nach *in vitro* Fusion durchgeführt. Sowohl in Caput-, als auch in Caudaspermien konnten die Phospholipide PC, PE und SM nachgewiesen werden. Die Phospholipide PI und PS konnten nur schwach bis gar nicht nachgewiesen werden. Der Hauptanteil an Phospholipiden in bovinen Nebenhodenspermien wurde durch Phosphatidylcholin (PC) gebildet und nahm von Caput zu Cauda um 46% ab. Der Gehalt an Phosphatidylethanolamin (PE) nahm drastisch um 70% von Caput- zu Caudaspermien ab. Der Gehalt an Sphingomyelin (SM) war in geringerer Konzentration nachzuweisen und nahm von Spermien des *Caput epididymidis* zu Spermien des *Cauda epididymidis* um 44% ab (Abb. 28, Tab. 8).

Nach der *in vitro* Fusion waren kaum signifikante Veränderungen der Phospholipidzusammensetzung boviner Nebenhodenspermien nachzuweisen, nur bei Spermien des Cauda Segmentes kam es zu einem signifikanten Anstieg der PE-Menge um 33% nach *in vitro* Fusion mit Caput Epididymosomen (Tab. 8, Abb. 30, 31).

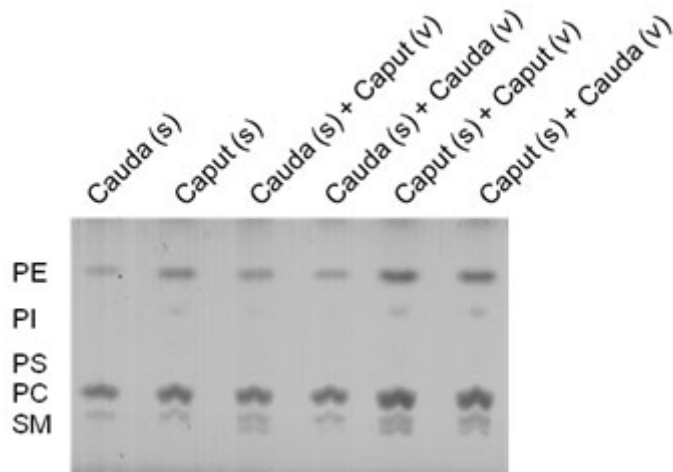


Abb. 28: Dünnschichtchromatographie extrahierter Lipide von bovinen Nebenhodenspermien (s) vor und nach *in vitro* Fusion mit bovinen Epididymosomen (e). PE - Phosphatidylethanolamin; PI - Phosphatidylinositol; PS - Phosphatidylserin; PC - Phosphatidylcholin; SM - Sphingomyelin.

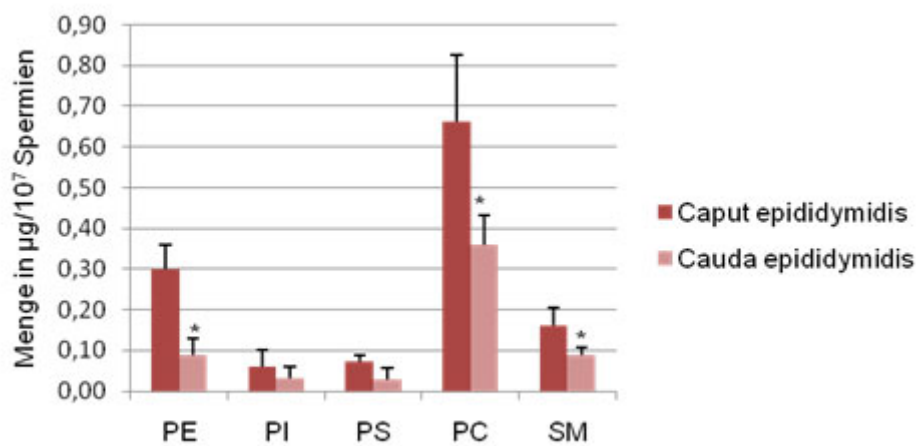


Abb. 29: Densitometrische Auswertung der über Dünnschichtchromatographie aufgetrennten Phospholipide boviner Nebenhodenspermien (Caput, Cauda). Die Messung erfolgte an 10^7 Spermatozoen. Standardabweichung dargestellt durch vertikale Balken; signifikante Veränderung zu den Caputspermien (*); $p < 0,05$ (N= 10)

Tab. 8: Densitometrische Auswertung der über Dünnschichtchromatographie aufgetrennten Phospholipide boviner Nebenhodenspermien durch *in vitro* Fusion mit bovinen Epididymosomen.

	PE µg/10 ⁷ Spermien	PI µg/10 ⁷ Spermien	PS µg/10 ⁷ Spermien	PC µg/10 ⁷ Spermien	SM µg/10 ⁷ Spermien
Caput-spermien	0,30 ± 0,06	0,06 ± 0,04	0,07 ± 0,01	0,66 ± 0,16	0,16 ± 0,04
+ Caput Vesikel	0,28 ± 0,02	0,08 ± 0,05	0,07 ± 0,01	0,57 ± 0,09	0,17 ± 0,03
+ Cauda Vesikel	0,31 ± 0,05	0,09 ± 0,06	0,05 ± 0,07	0,63 ± 0,12	0,16 ± 0,05
Cauda-spermien	0,09 ± 0,04*	0,03 ± 0,03	0,03 ± 0,03	0,36 ± 0,08*	0,09 ± 0,02*
+ Caput Vesikel	0,12 ± 0,02**	0,04 ± 0,04	0,03 ± 0,02	0,35 ± 0,08	0,09 ± 0,02
+ Cauda Vesikel	0,08 ± 0,03	0,02 ± 0,02	0,02 ± 0,03	0,34 ± 0,15	0,08 ± 0,05
	PE µg/ mg Protein	PI µg/ mg Protein	PS µg/ mg Protein	PC µg/ mg Protein	SM µg/ mg Protein
Caput Vesikel	3,78 ± 0,72	1,46 ± 1,55	2,87 ± 1,30	5,11 ± 1,73	5,76 ± 1,77
Cauda Vesikel	3,35 ± 1,35	0,51 ± 0,49	2,12 ± 1,67	3,95 ± 1,69	4,44 ± 2,37

Die Messung erfolgte an 10⁷ Spermatozoen. Mittelwert ± Standardabweichung, signifikante Veränderung zu den Caputspermien (*) oder Caudaspermien (**); p< 0,05; (N= 10). Zur besseren Übersicht wurde die Messung an den Epididymosomen in einer extra Tabelle unten mit aufgeführt.

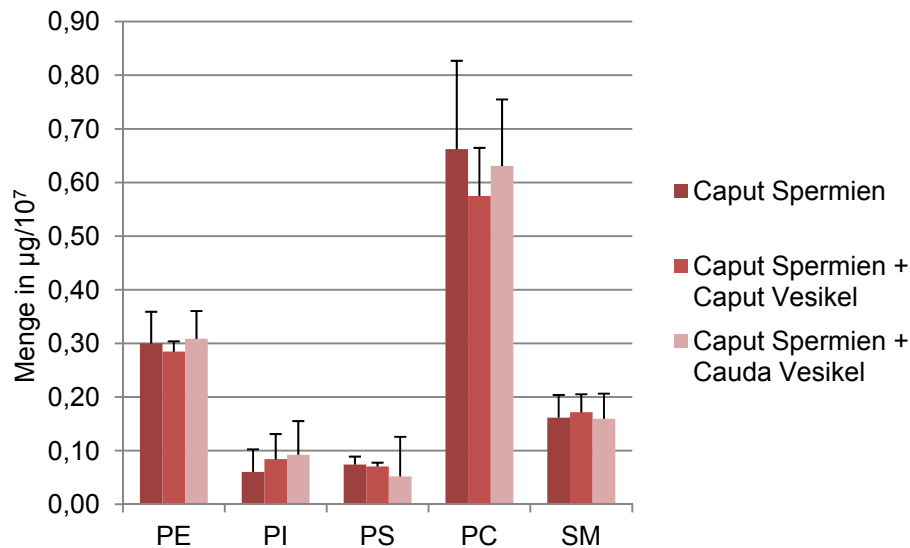


Abb. 30: Densitometrische Auswertung der über Dünnschichtchromatographie aufgetrennten Phospholipide boviner Caputpermien nach *in vitro* Fusion mit bovinen Epididymosomen. Die Messung erfolgte an 10^7 Spermatozoen. Standardabweichung dargestellt durch vertikale Balken. (N= 10)

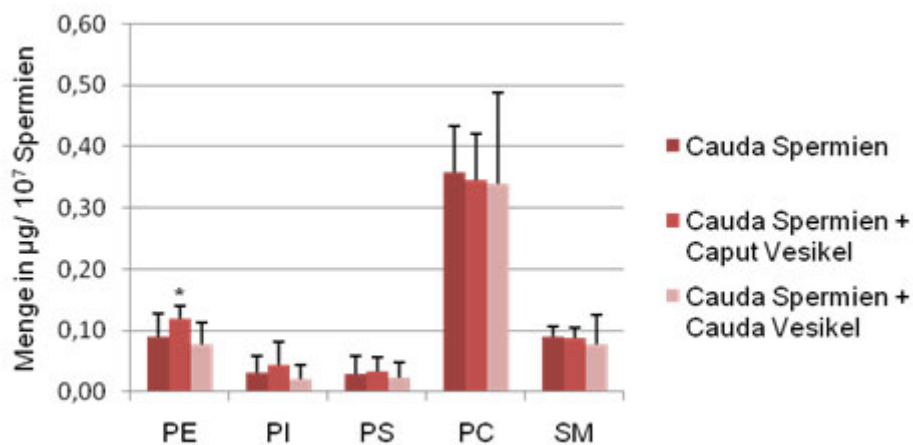


Abb. 31: Densitometrische Auswertung der über Dünnschichtchromatographie aufgetrennten Phospholipide boviner Caudaspermien nach *in vitro* Fusion mit bovinen Epididymosomen. Die Messung erfolgte an 10^7 Spermatozoen. Standardabweichung dargestellt durch vertikale Balken. Signifikante Veränderung zu den unfusionierten Caudaspermien (*); $p < 0,05$; (N= 10)

3.2.3 Übertragung von Proteinen auf die Spermienplasmamembran durch *in vitro* Fusion mit Epididymosomen

Vor der Analyse des Proteintransfers mittels *in vitro* Fusion, wurde die Proteinzusammensetzung der Mikrosomen der Spermien aus den unterschiedlichen Nebenhodenabschnitten mittels SDS-Page und anschließend mittels Coomassie-Blau-Färbung untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Mikrosomen der Spermien aus dem Nebenhodenkopf zu den Mikrosomen der

Spermien aus dem Nebenhodenschwanz stärker ausgeprägte Banden im Bereich von 130 kDa, unterhalb von 100 kDa und bei 72 kDa aufwiesen (Abb. 32*). Hingegen konnte bei den Mikrosomen von Spermien des Cauda Segmentes oberhalb von 100 kDa zwei stark ausgeprägte Banden dokumentiert werden (Abb. 32#), die bei den Mikrosomen der Spermien aus dem Caput Segment nur schwach sichtbar waren.

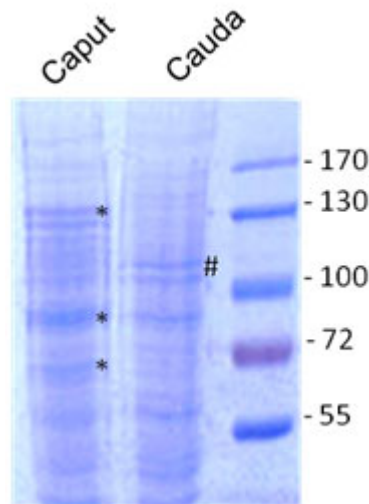


Abb. 32: Auftrennung der Membranproteine von Nebenhodenspermien des Caput und Cauda Segmentes im SDS-Gel (7,5%) und Färbung der Proteine mit Coomassie-Blau. Auftragsvolumen: 30 µg Protein.

Zur Analyse des Proteintransfers von Epididymosomen auf Nebenhodenspermien wurden Biotin-markierte Nebenhodenvesikel mit Spermien *in vitro* fusioniert. Die mit Epididymosomen fusionierten Spermien wurden anschließend immunzytologisch mit einem Antikörper gegen Biotin (Streptavidin Alexa 488) untersucht. Nach der Fusion konnten Biotin-markierte Proteine auf bovinen Spermatozoen besonders am Hals- und Mittelstück und in der postakrosomalen Region, als auch teilweise im Hauptstück nachgewiesen werden (Abb. 33). Im Einzelnen konnten folgende regionale Übertragungen von Biotin-markierten Proteinen beobachtet werden. Bei *in vitro* fusionierten Caputspermien mit Caput bzw. Cauda Epididymosomen konnten Proteine im Bereich des Hals-, Mittel- und Hauptstück, sowie in der postakrosomalen Region nachgewiesen werden (Abb. 33A, B). Bei Caputspermien mit Cauda Epididymosomen konnte die Fluoreszenz bis ins Endstück beobachtet werden, wobei der Anfangsteil des Hauptstückes und die postakrosomalen Region negativ waren (Abb. 33B). Caudaspermien zeigten nach *in vitro* Fusion mit Biotin-markierten Caput bzw. Cauda Epididymosomen im Hauptstück eine

erhöhte Fluoreszenz (Abb. 33C, D). Caudaspermien die mit Biotin-markierten Cauda Epididymosomen *in vitro* fusioniert wurden, zeigten zusätzlich im Bereich des Mittelstückes eine Proteinübertragung (Abb. 33D). Als Negativkontrolle dienten unfusionierte Spermien, sodass eine Eigenfluoreszenz der Spermien ausgeschlossen werden konnte (Abb. 33E, F).

Zusätzlich zur immunzytologischen Untersuchung wurde über Westernblot-Analyse die Größe der übertragenen Biotin-markierten Proteine analysiert (Abb. 34). Ein Ziel der Arbeit war, die Übertragung der PMCA von Epididymosomen auf Spermien zu analysieren. Daher war es besonders interessant zu schauen, ob Proteine im Bereich von 130 kDa übertragen wurden. Im Westernblot zeigten sich kaum Unterschiede bei den übertragenen Proteinen von Caput oder Cauda Vesikeln. Durch die Fusion wurden vermehrt Biotin-markierte Proteine mit der Größe um 130 kDa, 72 kDa und 55 kDa auf die Nebenhodenspermien übertragen (Abb. 34). An unmarkierten und unfusionierten Nebenhodenspermien wurden keine Banden detektiert (Abb. 34).

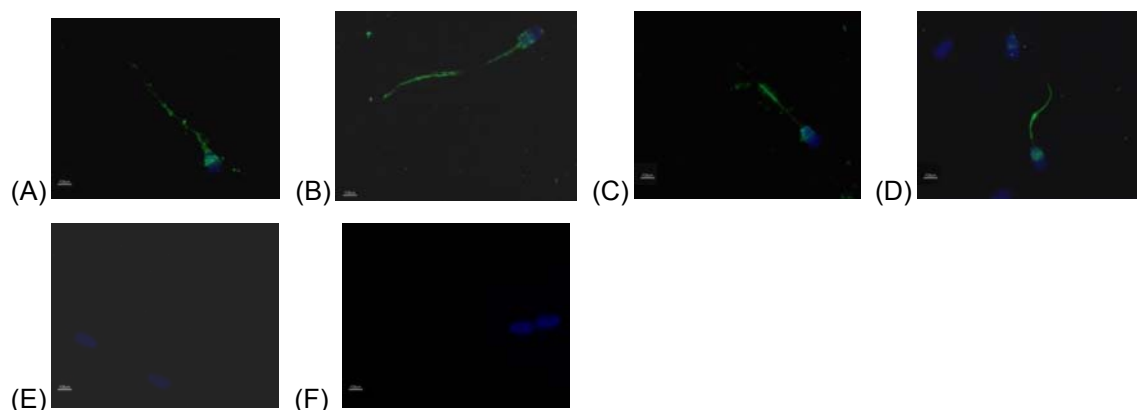


Abb. 33: Immunhistologischer Nachweis des Proteintransfers von Biotin-markierten Proteinen der Epididymosomen auf bovine Spermatozoen mittels *in vitro* Fusion (pH 6,5). Caput Spermatozoen mit Caput Epididymosomen (A) oder Cauda Epididymosomen (B); Cauda Spermatozoen mit Caput Epididymosomen (C) oder Cauda Epididymosomen (D). Als Negativkontrolle dienten unfusionierte Spermien (E, F). N= 2; Balken= 6 μ m

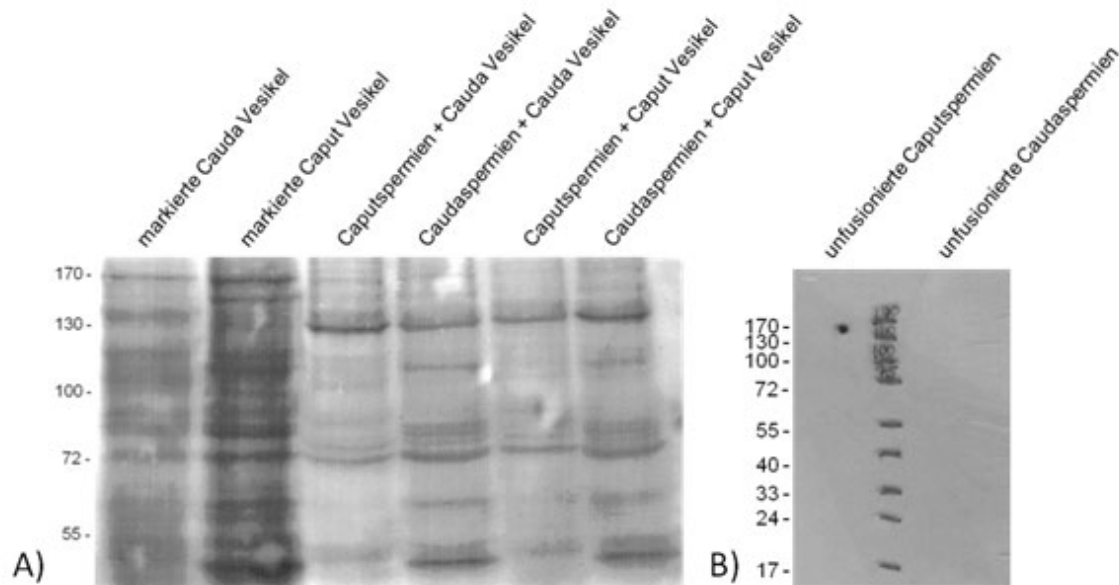


Abb. 34: Westernblot-Analyse von Biotin-markierten Proteinen. (A) Biotin-makierte Epididymosomen (15 µg) und Mikrosomen (30 µg) von *in vitro* fusionierten Spermien mit Biotin-markierten Epididymosomen. (B) Als Negativkontrolle dienten unmarkierte, unfusionierte Mikrosomen (30 µg) von Spermien des Caput und Cauda Segmentes. Die Biotin-markierten Proteine wurden mit Streptavidin-POX-Konjugat detektiert. N= 2

3.2.3.1 Detektion der PMCA Isoformen in bovinen Nebenhodenspermien vor und nach *in vitro* Fusion mit Epididymosomen

Um zu untersuchen, ob PMCA4 oder deren Spleißvariante PMCA4a von Epididymosomen auf Spermien übertragen wird, wurden Nebenhodenspermien vor und nach *in vitro* Fusion mit Epididymosomen mittels Immunfluoreszenz mit Antikörper gegen PMCA (5F10), PMCA4 (JA9) und PMCA4a analysiert.

Durch immunzytochemische Färbungen wurde die PMCA (Isoform 1 - 4) im Bereich des Hals- und Mittelstücks boviner Spermatozoen des Nebenhodenkopfes und Nebenhodenschwanzes lokalisiert (Abb. 35, 36). Nach *in vitro* Fusion boviner Spermien mit Epididymosomen zeigte sich keine Veränderung in der Lokalisation der PMCA (Isoform 1 - 4).

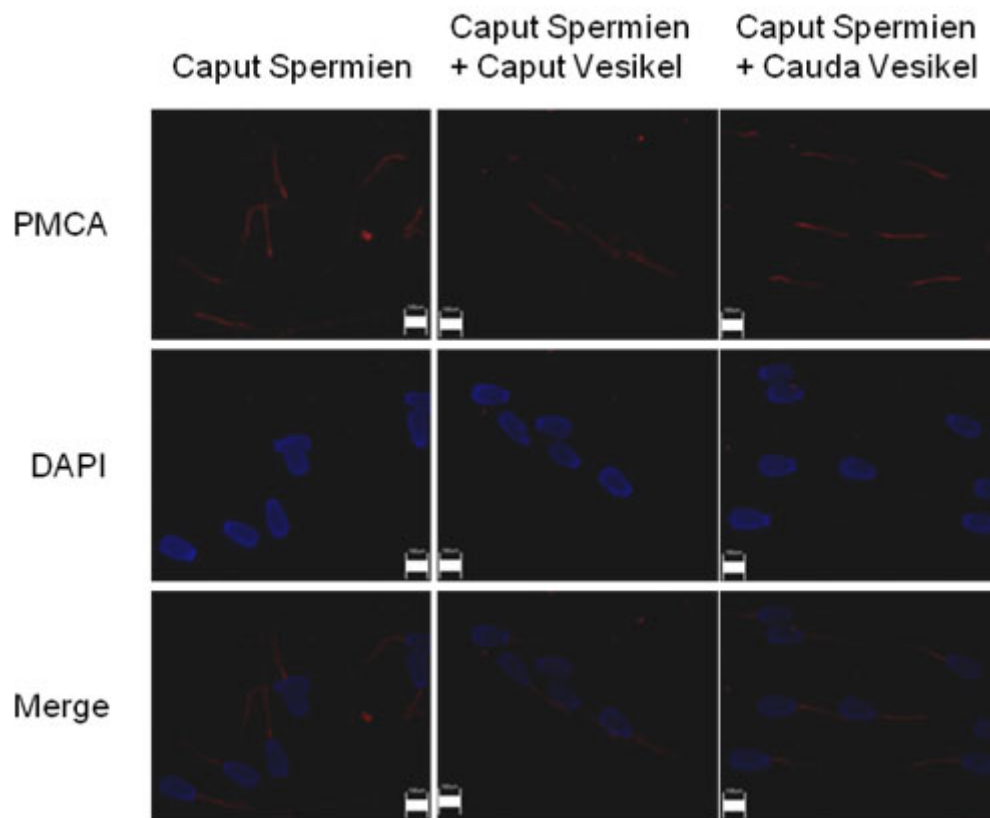


Abb. 35: Immunzytochemischer Nachweis der PMCA (Isoform 1 - 4) an bovinen Spermien der *Caput epididymidis*. DAPI zeigt die Kernfärbung. Emission: $\lambda = 565 \text{ nm}$. N= 9; Balken= $6 \mu\text{m}$

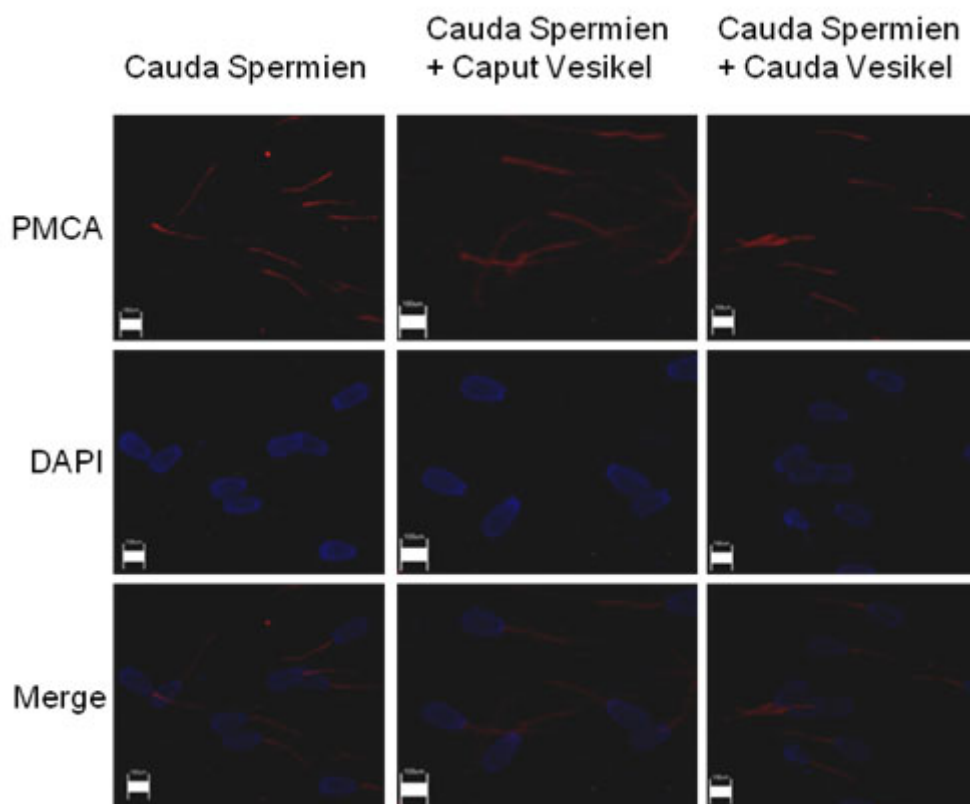


Abb. 36: Immunzytochemischer Nachweis der PMCA (Isoform 1 - 4) an bovinen Spermien der *Cauda epididymidis*. DAPI zeigt die Kernfärbung. Emission: $\lambda = 565 \text{ nm}$. N= 9; Balken= $6 \mu\text{m}$

Die Isoform PMCA4 konnte in Caputpermien nahezu gar nicht und in Caudaspermien schwach im Bereich des Mittelstückes lokalisiert werden. Nach *in vitro* Fusion boviner Spermien mit Cauda Vesikeln zeigte sich ein leichter Fluoreszenzanstieg im Hals- und Mittelstück (Abb. 37, 38).

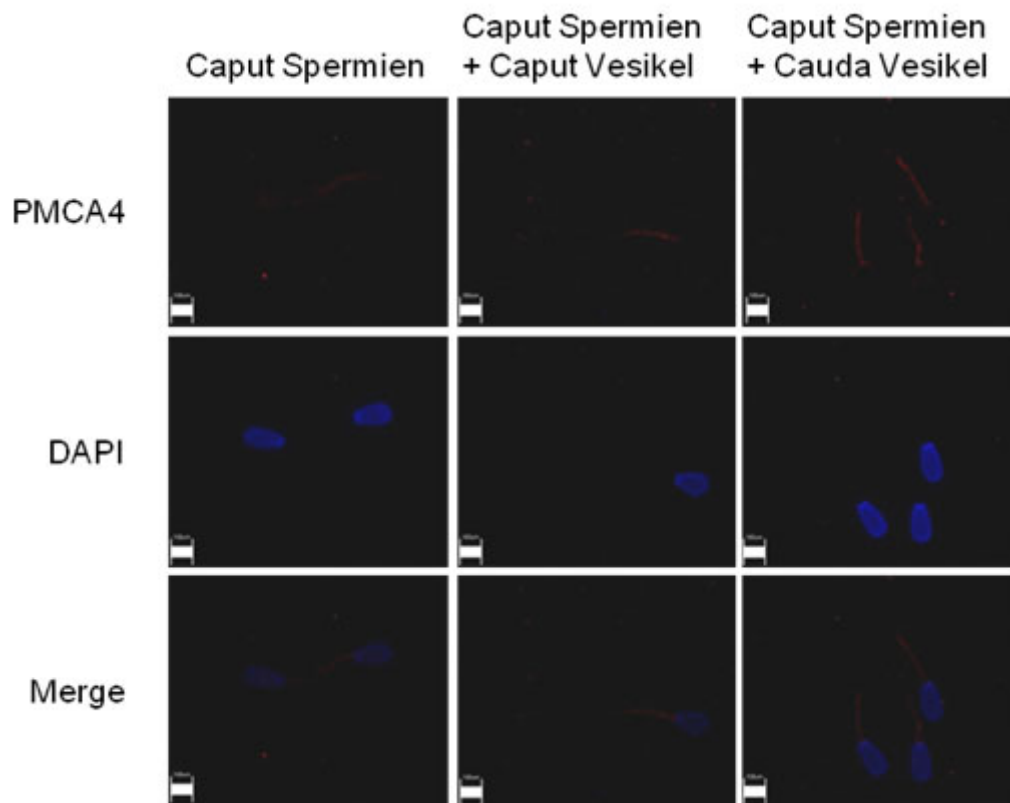


Abb. 37: Immunzytochemischer Nachweis der PMCA4 an bovinen Spermien des *Caput epididymidis*. DAPI zeigt die Kernfärbung. Emission: $\lambda = 565$ nm. N= 9; Balken= 6 µm

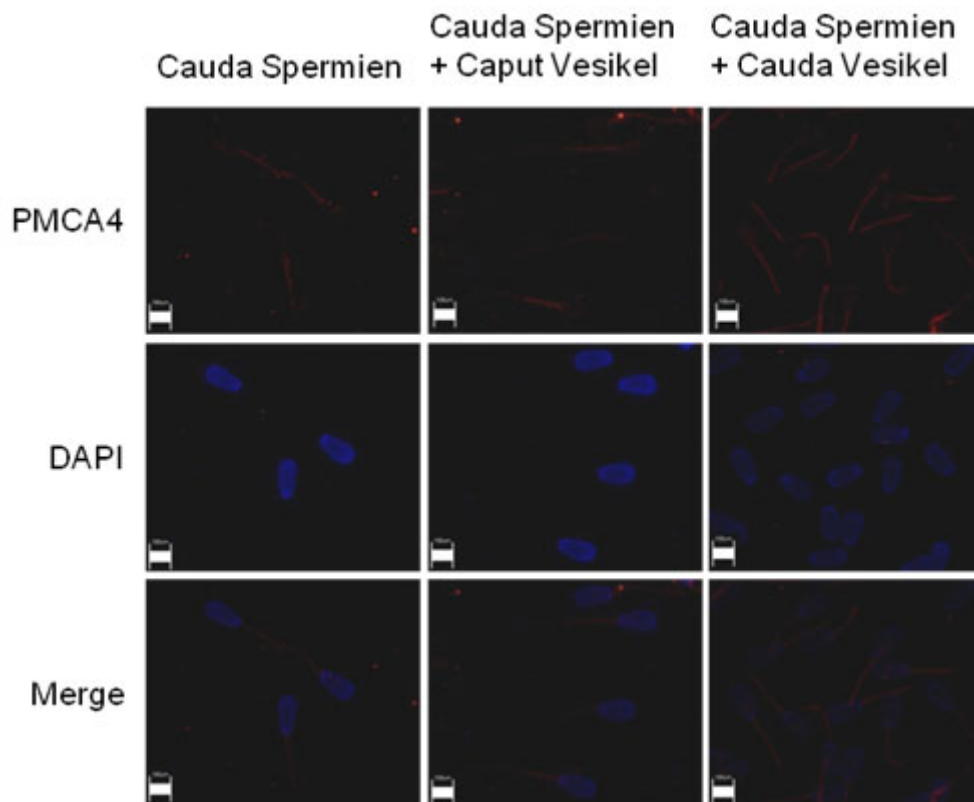


Abb. 38: Immunzytochemischer Nachweis der PMCA4 an bovinen Spermien der *Cauda epididymidis*. DAPI zeigt die Kernfärbung. Emission: $\lambda = 565 \text{ nm}$. N= 9; Balken= $6 \mu\text{m}$

PMCA4a ließ sich bei Caputspermien vor und nach *in vitro* Fusion nur punktuell im Bereich des Mittel- und Hauptstückes nachweisen (Abb. 39). Die Caudaspermien zeigten ebenfalls eine schwache punktuelle Fluoreszenz nach Inkubation mit dem PMCA4a Antikörper im Bereich des Mittel- und Hauptstückes vor und nach *in vitro* Fusion (Abb. 40). Neben der schwachen punktuellen Färbung, konnte eine starke akrosomale Färbung detektiert werden.

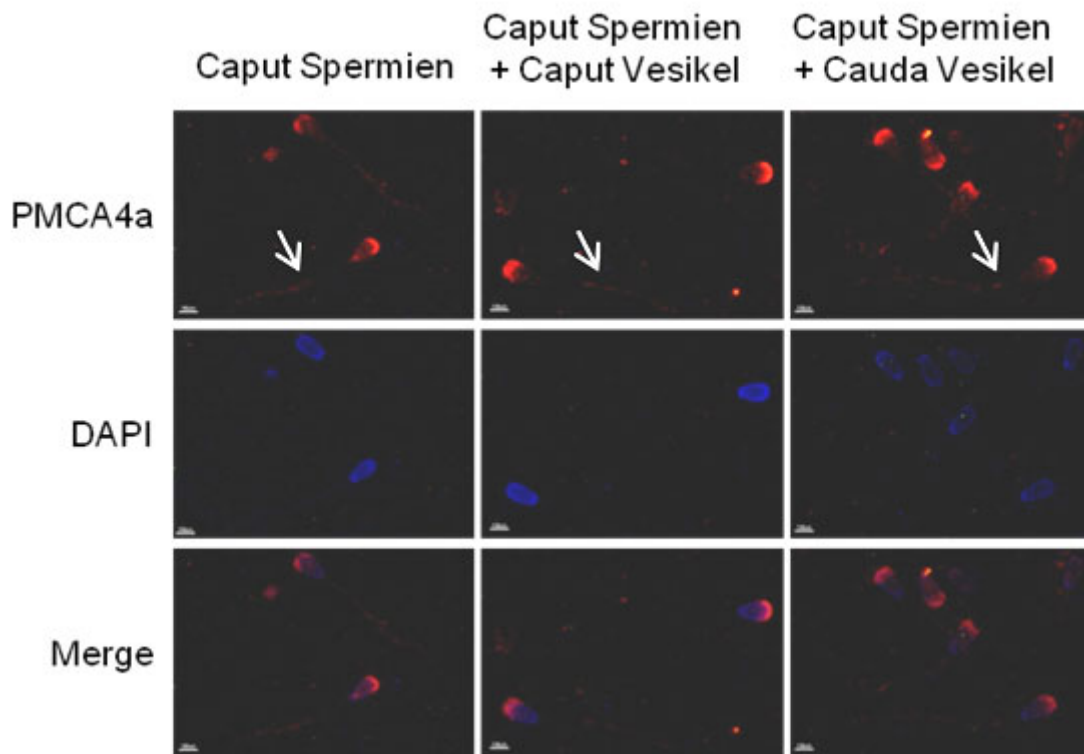


Abb. 39: Immunzytochemischer Nachweis der PMCA4a an bovinen Spermien des *Caput epididymidis* (weißer Pfeil). DAPI zeigt die Kernfärbung. Emission: $\lambda = 565$ nm. N= 3; Balken= 6 μ m

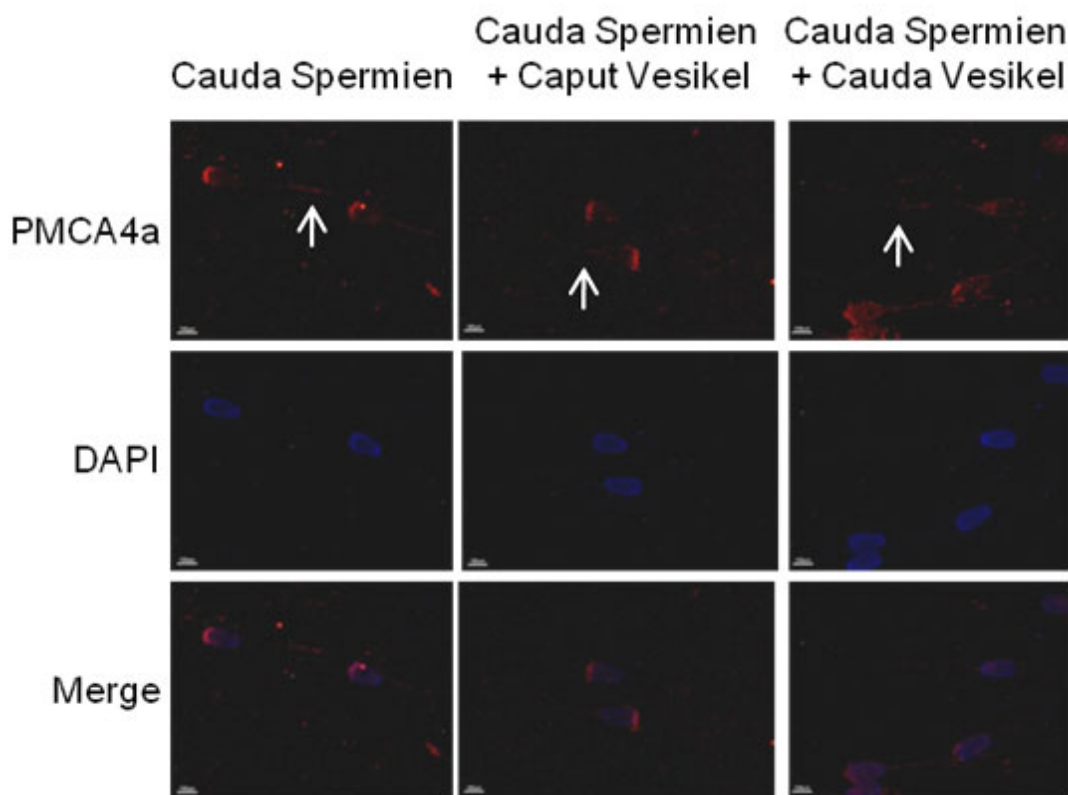


Abb. 40: Immunzytochemischer Nachweis der PMCA4a an bovinen Spermien der *Cauda epididymidis* (weißer Pfeil). DAPI zeigt die Kernfärbung. Emission: $\lambda = 565$ nm. N= 3; Balken= 6 μ m

3.2.3.2 Untersuchung der Ca^{2+} -ATPase-Aktivität boviner Nebenhodenspermien

Vorausgehende Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe belegten eine Zunahme der Ca^{2+} -ATPase-Aktivität von Spermien aus dem Nebenhodenkopf zu Spermien aus dem Nebenhodenschwanz (Sanchez-Luengo et al. 2004). Daher sollte nun untersucht werden, ob sich die Ca^{2+} -ATPase-Aktivität der Spermien nach *in vitro* Fusion mit Epididymosomen ändert.

Eine Zunahme der Ca^{2+} -ATPase-Aktivität in bovinen Nebenhodenspermien vom Caput zum Cauda Segment konnte auch in der hier durchgeführten Untersuchung bestätigt werden (Abb. 41, Tab. 9). Die Mg^{2+} -abhängige Ca^{2+} -ATPase-Aktivität, welche die PMCA-Aktivität mit einbezieht (Niggli et al. 1979; Robinson 1976), erhöhte sich von Caput- zu Caudaspermien um 31% (Tab. 9). Die Mg^{2+} -unabhängige Ca^{2+} -ATPase-Aktivität nahm von Spermien aus dem *Caput epididymidis* zu Spermien aus dem *Cauda epididymidis* um 110% zu (Tab. 9).

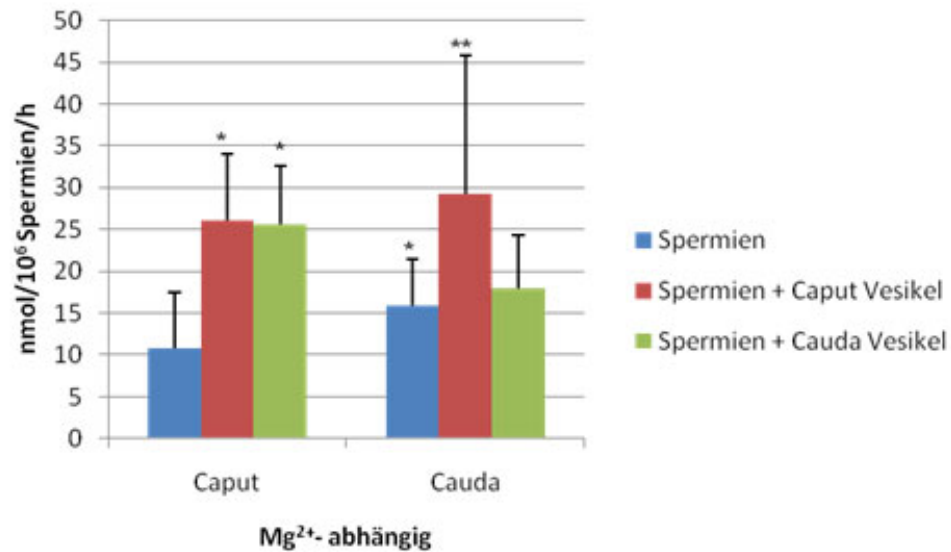
Tab 9.: Ca^{2+} -ATPase-Aktivität boviner Nebenhodenspermien.

	Mg^{2+} -abhängig		Mg^{2+} -unabhängig	
	Caput epididymidis	Cauda epididymidis	Caput epididymidis	Cauda epididymidis
nmol Pi/ 10⁶ Spermien/ h	11 ± 7	16 ± 6*	20 ± 8	42 ± 14*

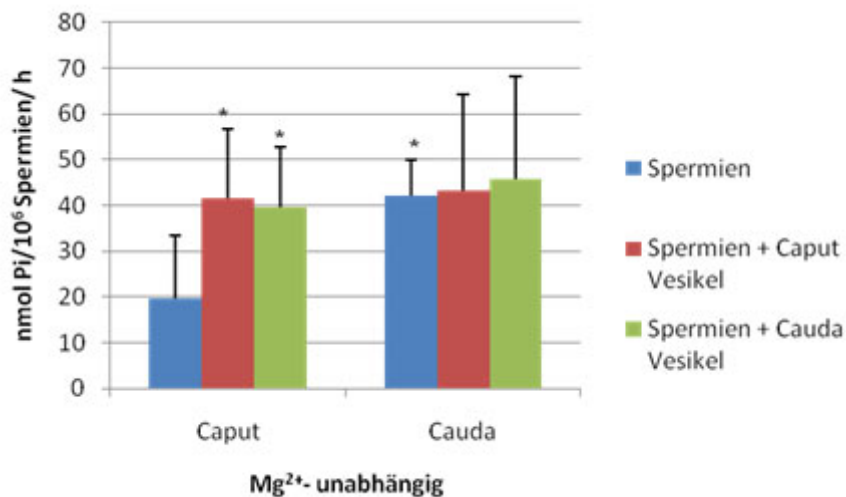
(*) signifikante Veränderung entlang des Nebenhodentraktes; Mittelwert ± Standardfehler, $p < 0,05$; (N= 7 - 10)

Nach *in vitro* Fusion boviner Nebenhodenkopfspermien mit Epididymosomen (Caput/Cauda) verdoppelte sich die Mg^{2+} -abhängige Ca^{2+} -ATPase-Aktivität signifikant. Bei den Nebenhodenschwanzspermien konnte eine Erhöhung um 123% nach der Fusion mit Caput Vesikeln gemessen werden. Die *in vitro* fusionierten bovinen Caudaspermien mit Cauda Vesikeln wiesen keine signifikante Veränderung der Mg^{2+} -abhängigen Ca^{2+} -ATPase-Aktivität auf (Abb. 41A). Die mit Epididymosomen (Caput, Cauda) *in vitro* fusionierten Caputspermien hatten eine zweifach höhere Mg^{2+} -unabhängige Ca^{2+} -ATPase-Aktivität als unbehandelte Caput Spermatozoen. Die Mg^{2+} -unabhängige Ca^{2+} -ATPase-Aktivität ähnelte denen der unfusionierten Caudaspermien. Hingegen

änderte sich die Mg^{2+} -unabhängige Ca^{2+} -ATPase-Aktivität der Caudaspermien nach *in vitro* Fusion mit Epididymosomen nicht signifikant (Abb.41B).



(A)



(B)

Abb. 41: (A) Mg^{2+} -abhängige und (B) Mg^{2+} -unabhängige Ca^{2+} -ATPase-Aktivität boviner Nebenhodenspermien (Anzahl: 10^6) vor und nach *in vitro* Fusion mit Epididymosomen. Signifikante Veränderung zu den Caputspermien (*) oder Caudaspermien (**). Standardabweichung dargestellt durch vertikale Balken. (N= 7 - 10); $p < 0,05$

Durch Zugabe des sekretorischen Proteins PDC-109 (20 μ g) ließ sich eine signifikante Zunahme der Ca^{2+} -ATPase-Aktivität boviner Nebenhodenspermien vor und nach *in vitro* Fusion mit Epididymosomen messen. Unfusionierte Caudaspermien zeigten nach Stimulation mit PDC-109 eine höhere ATPase-Aktivität im Vergleich zu Caputspermien. Allerdings ist die prozentuale Stimulation der unfusionierten Caudaspermien durch PDC-109 geringer (Mg^{2+} -abhängig: 350%; Mg^{2+} -unabhängig: 63%) im Vergleich zu unfusionierten Caputspermien (Mg^{2+} -abhängig: 518%; Mg^{2+} -unabhängig: 100%) (Abb. 42, 43).

Eine gleiche bis verringerte Aktivität aber geringere prozentuale Stimulation der Mg^{2+} -abhängigen Ca^{2+} -ATPase mit PDC-109 wurde bei *in vitro* fusionierten Caputpermien im Vergleich zu unfusionierten Caputpermien gemessen (Caputpermien: 518%; Caputpermien + Caputvesikel: 96%; Caputpermien + Caudavesikel: 242%) (Abb. 42). Eine verringerte prozentuale Stimulation, aber höhere Mg^{2+} -abhängige Ca^{2+} -ATPase-Aktivität wurde bei *in vitro* fusionierten Caudaspermien mit Caputvesikeln im Vergleich zu unfusionierten Caudaspermien nach PDC-109 Stimulation dokumentiert (Caudaspermien: 350%; Caudaspermien + Caputvesikel: 214%). Dagegen konnte bei *in vitro* fusionierten Caudaspermien mit Caudavesikeln eine erhöhte prozentuale Stimulation und erhöhte Mg^{2+} -abhängige Ca^{2+} -ATPase-Aktivität nach PDC-109 Stimulation gemessen werden (Caudaspermien: 350%; Caudaspermien + Caudavesikel: 389%) (Abb.42).

Die *in vitro* fusionierten Caputpermien zeigten eine höhere Mg^{2+} -unabhängige Ca^{2+} -ATPase-Aktivität nach PDC-109 Behandlung, aber eine geringere prozentuale Stimulation durch PDC-109 im Vergleich zu unfusionierten Caputpermien (Caputpermien: 100%; Caputpermien + Caputvesikel: 88%; Caputpermien + Caudavesikel: 63%) (Abb. 43). Bei *in vitro* fusionierten Caudaspermien ließ sich eine erhöhte Aktivität der Mg^{2+} -unabhängigen Ca^{2+} -ATPase nach Zugabe von PDC-109 zu *in vitro* fusionierten Spermien ohne PDC-109 Behandlung messen, als auch eine erhöhte prozentuale Stimulation durch PDC-109 im Vergleich zu unfusionierten Caudaspermien (Caudaspermien: 63%; Caudaspermien + Caputvesikel: 188%; Caudaspermien + Caudavesikel: 184%) (Abb. 43).

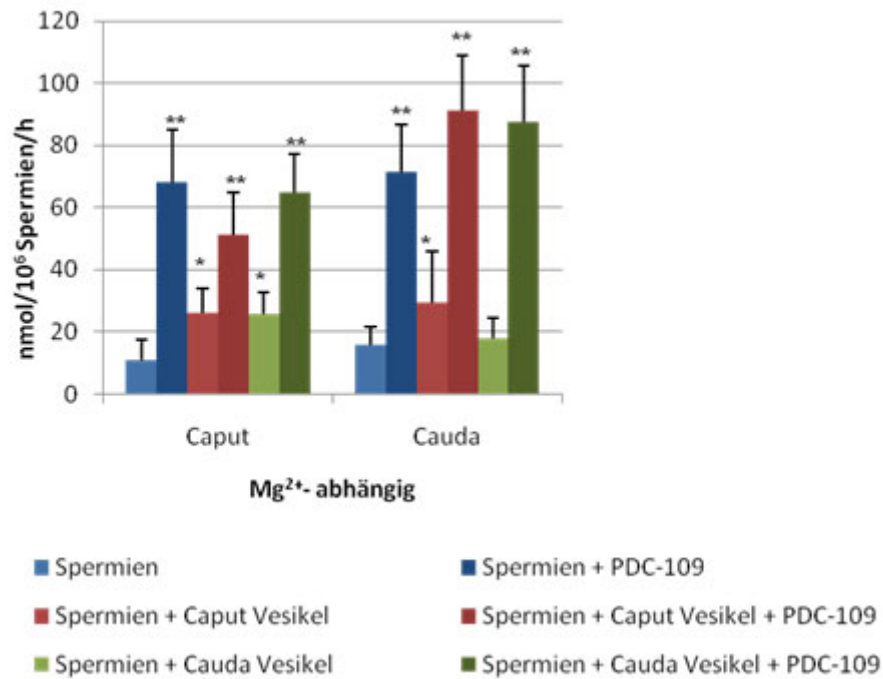


Abb. 42: Einfluss von PDC-109 (20 μ g) auf die Mg^{2+} -abhängige Ca^{2+} -ATPase-Aktivität boviner Nebenhodenspermien (10^6) vor und nach *in vitro* Fusion mit Epididymosomen. (*) signifikante Veränderung nach *in vitro* Fusion; (**) signifikante Veränderung nach Zugabe von PDC-109; Standardabweichung dargestellt durch vertikale Balken. (N= 6); $p < 0,05$

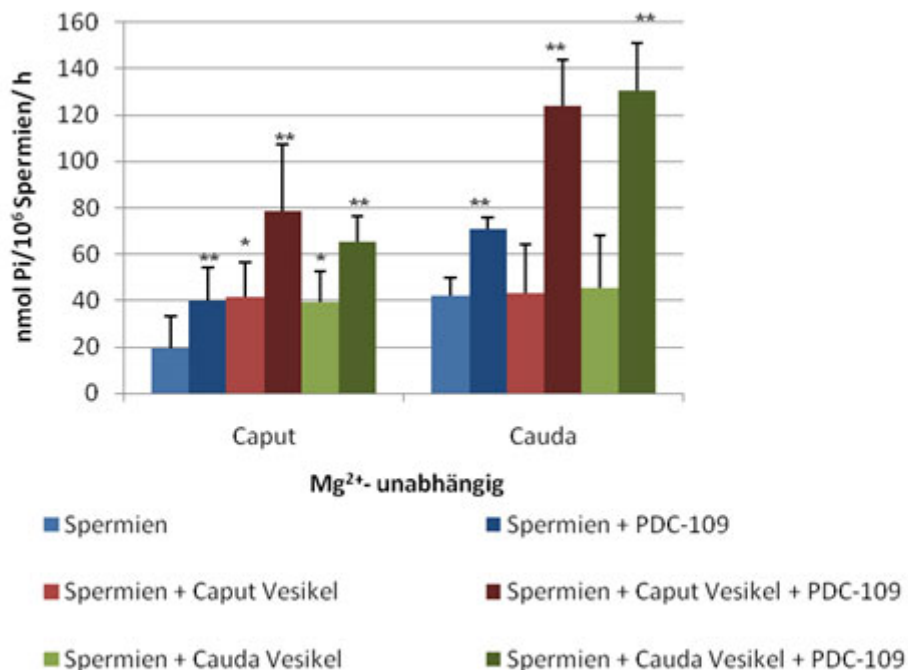


Abb. 43: Einfluss von PDC-109 (20 μ g) auf die Mg^{2+} -unabhängige Ca^{2+} -ATPase-Aktivität boviner Nebenhodenspermien (10^6) vor und nach *in vitro* Fusion mit Epididymosomen. (*) signifikante Veränderung nach *in vitro* Fusion; (**) signifikante Veränderung nach Zugabe von PDC-109; Standardabweichung dargestellt durch vertikale Balken. (N= 6); $p < 0,05$

4 Diskussion

Der Nebenhoden und die akzessorischen Geschlechtsdrüsen exportieren „membranöse“ Vesikel die vom apikalen Zellpol der Epithelzellen abgeschnürt werden (Agrawal & Vanha-Perttula 1988, Fornes & De Rosas 1991). Es wird postuliert, dass diese Vesikel eine entscheidende Rolle bei der Spermienreifung, für den Schutz der Spermien und für deren Viabilität spielen (Hermo & Jacks 2002). Bisherige Veröffentlichungen haben „membranöse“ Vesikel im Nebenhoden verschiedenster Spezies beschrieben (Affe (Ramos & Dym 1977), Maus (Hermo & Jacks 2002, Rejraji et al. 2006), Ratte (Eickhoff et al. 2001; Fornes & De Rosas 1991; Fornes et al. 1995), Mensch (Frenette et al. 2005), Schaf (Gatti, et al. 2005), Hamster (Legare et al. 1999a; Yanagimachi et al. 1985), Bulle (Agrawal & Vanha-Perttula 1988; Frenette et al. 2010; Frenette & Sullivan 2001; Frenette et al. 2002; Frenette et al. 2006)). Im ersten Teil der hier vorliegenden Arbeit sollten die Nebenhodenvesikel des bovinen Nebenhodens isoliert und sowohl morphologisch als auch biochemisch (Lipide, Proteine, Ca^{2+} -ATPase) charakterisiert werden. Im zweiten Teil sollte überprüft werden, ob Nebenhodenvesikel mit Nebenhodenspermien fusionieren und ob Lipide und Proteine (insbesondere PMCA) übertragen werden.

4.1 Morphologische Charakterisierung boviner Epididymosomen

Die in dieser Arbeit isolierten bovinen Nebenhodenvesikel waren in ihrer Form rund bis oval. Die bovinen Epididymosomen des Cauda Segmentes (150 - 750 nm) waren überwiegend größer als die Epididymosomen des Caput Segmentes (90 - 450 nm) und ähneln in der Größe den Vesikeln die über Ultrazentrifugation aus dem Nebenhodensekret von Mäusen (50 – 800 nm) (Rejraji et al. 2006) gewonnen wurden. Neuste Veröffentlichung beschrieb bovine Cauda Epididymosomen mit einer Größe von 50 - 250 nm nach Fraktionierung mittels diskontinuierlichen Sucrose-Dichtegradienten (Frenette et al. 2010). Diese veröffentlichten Messwerte liegen unter den Messwerten der untersuchten Cauda Epididymosomen in dieser Arbeit. Allerdings wurden in der Publikation nur bestimmte Fraktionen („Protein-beinhaltende Vesikel“) der Cauda

Epididymosomen vermessen (Frenette et al. 2010). Auch Fornes et al. (1995) untersuchte mittels diskontinuierlichen Dichtgradienten Vesikel des Rattennebenhodenschwanzes, die eine Größe von 0,2 - 3,5 μm aufwiesen (Fornes et al. 1995) und somit größer sind als die bovine Epididymosomen des Cauda Segmentes. Mittels Ultrazentrifugation gewonnene Vesikel aus dem Sekret des Hamsternebenhodens (50 – 200 nm) (Legare et al. 1999a), des Nebenhodenkopfes der Ratte (≤ 20 nm) (Eickhoff et al. 2001) und des Nebenhodenschwanzes des Schafbocks (25 – 75 nm) (Gatti et al. 2005) sind im Vergleich zu den bovinen Vesikeln dieser Arbeit kleiner. Im Gegensatz dazu maßen Ausstülpungen des bovinen Nebenhodenepithels und abgeschnürte Vesikel im Lumen des Nebhodenganges einen Durchmesser von 2 – 5 μm (Eickhoff et al. 2006). Die apikalen Epithelausstülpungen und Vesikel waren damit um einiges größer als die untersuchten Vesikel dieser Arbeit. Vergleichbare Größen von Epithelausstülpungen (2 – 5 μm) und Vesikel (1 – 5 μm) wurden auch für den murinen Nebenhodenkopf beschrieben (Rejraji et al. 2006) und lassen sich auch auf apokrine Vesikel der Rattenkoagulationsdrüse ableiten (Wilhelm et al. 1998). Anzumerken ist, dass es sich bei den letztgenannten Vesikelgrößen im μm -Bereich nicht um Größen von isolierten Vesikeln handelt, sondern immer um Größen von Vesikeln die am Ultradünnschnitt von Nebenhoden- bzw. Koagulationsdrüsengewebe bestimmt wurden. Dies könnte der Grund für den Größenunterschied im Vergleich zu den durch Ultrazentrifugation gewonnenen Vesikeln sein.

Um zu überprüfen, ob die über Ultrazentrifugation gewonnenen Vesikel tatsächlich Aposomen und nicht spontan gebildete Plasmamembranfragmente oder Zelltrümmer waren, wurde mittels Westernblot untersucht, ob die Vesikel die Proteine MIF (Makrophagen Migrations inhibierender Faktor) und LDH (Laktatdehydrogenase) beinhalten. In den bovinen Nebenhodenvesikeln konnte das Protein MIF mittels Antikörper nachgewiesen werden. Der Antikörper gegen LDH zeigte bei dem Nebenhodenvesikeln keine Bande im Westernblot. Bisher durchgeführte biochemische und elektronenmikroskopische Untersuchungen an der Koagulationsdrüse der Ratte hatten gezeigt, dass klassische zytoplasmatische Proteine wie die LDH weder im Sekret noch in Aposomen nachzuweisen sind. LDH wird demnach nicht in die Aposomen transloziert, sondern verbleibt im Zytoplasma (Wilhelm et al. 1998). MIF wurde in vorherigen

Untersuchungen in Vesikeln des Ratten- und des Bullennebenhodens als apokrin sekretiertes Protein der Nebenhodenepithelzellen identifiziert (Eickhoff et al. 2001; Eickhoff et al. 2006). Daher bestätigt sich die Annahme der Autorin, dass die untersuchten Vesikel in der hier vorliegenden Arbeit apokrin sekretierten Ursprungs waren.

Die hier isolierten bovinen Caput Epididymosomen und auch kleinere Cauda Epididymosomen zeigten elektronendichtes, granuläres Material, wobei die größeren Cauda Epididymosomen eher leer erschienen. Dies bestätigen bisherige Untersuchungen an isolierten Vesikeln aus dem Nebenhodensekret des Schafbocks, der Ratte und der Maus (Eickhoff et al. 2001; Gatti et al 2005; Rejraji et al. 2006). Untersuchungen mittels diskontinuierlichen Sucrose-Dichtegradierten bewiesen zwei verschiedene Populationen der Cauda Epididymosomen (Frenette et al. 2010). Die bovinen Cauda Epididymosomen mit hoher Dichte zeigten dabei eine hohe Proteinkonzentration und ein hohes elektronendichtes Aussehen, im Vergleich zu den Cauda Epididymosomen mit geringerer Dichte (Frenette et al. 2010), wobei sich die Epididymosomen nicht in ihrer Größe unterschieden. Auch in Vesikeln auf bovinen Nebenhodengewebeschnitten konnte granuläres Material in den epithelialen Ausstülpungen dokumentiert werden (Agrawal & Vanha-Perttula 1988). Publikationen von murinen Nebenhodengewebeschnitten zeigten einen homogenen Inhalt in den apikalen Epithelausstülpungen, sowie multivesikuläre Bodies (20 – 500 nm) an der Verbindungsstelle zwischen epithelialer Ausstülpung und apikalem Zytoplasma (Rejraji et al. 2006).

Auch wenn die Definition des Begriffs Epididymosomen keine Bedeutung für die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente hat und alle Arbeitsgruppen die Nebenhodenvesikel prinzipiell über gleiche Methoden isolieren und folglich mit den gleichen Vesikeln arbeiten, soll an dieser Stelle noch mal auf den Begriff der „Epididymosomen“ (Nebenhodenvesikel) eingegangen werden. Dieser Begriff wird in der Literatur unterschiedlich benutzt bzw. die Herkunft unterschiedlich beschrieben. Arbeiten aus unserem Haus (AG Seitz) setzten den Begriff Epididymosomen (Nebenhodenvesikel) gleich Aposomen, also gleich apikale Abschnürungen, die z.B. auch für die Koagulationsdrüse gezeigt wurden (Wilhelm et al. 1998). In den Aposomen des Nebenhodens wurde das

o.g. apokrin sezernierte Protein MIF nachgewiesen (Eickhoff et al. 2001; Eickhoff et al. 2006). Hingegen behaupten die Arbeitsgruppen Sullivan et al. (2007), Rejraji et al. (2006) und Hermo & Jacks (2002), dass innerhalb der Aposomen 20 nm kleine membranöse Vesikel vorkommen, die später durch Auflösung (Fragmentierung) der Aposomenmembran ins Nebenhodensekret gelangen (Hermo & Jacks 2002, Rejraji et al. 2006; Sullivan et al. 2007). Diese kleineren Vesikel innerhalb der Aposomen werden von diesen Arbeitsgruppen als Epididymosomen bezeichnet. Bisher wurde jedoch weder die Entstehung der Vesikel innerhalb der Aposomen, noch die Fragmentierung der Aposomen im Nebenhoden-Lumen und damit die Freilassung von Vesikeln nachgewiesen. Auch sieht die Autorin kritisch, wie z.B. MIF, das im Zytoplasma außerhalb des Endomembrankompartiments synthetisiert und in die Aposomen transloziert wird, in Vesikel innerhalb der Aposomen gelangen soll. Auch wenn die in dieser Arbeit isolierten Vesikel kleiner sind als die Aposomen auf den elektronenmikroskopischen Aufnahmen von Nebenhodengewebe (Eickhoff et al. 2006), favorisiert die Autorin der Arbeit, dass es sich bei den hier isolierten Vesikeln um Aposomen handelt, die möglicherweise durch die Aufarbeitung und Ultrazentrifugation schrumpften. Diese Annahme wird durch den o. g. Nachweis, das MIF in den Aposomen vorkommt und LDH nicht nachzuweisen war erhärtet. Im Folgenden wird der Begriff Epididymosomen mit den Vesikeln, die aus dem Sekret des Nebenhodens isoliert wurden, gleichgesetzt.

Weitere in der Literatur beschriebene Vesikel stammen aus der Prostata. Isolierte Prostatasomen haben eine Größe von über 150 - 200 nm (Arienti et al. 1997) und sind mit elektronendichtem, granulärem Material gefüllt (Brody et al. 1983) und ähneln damit eher den Caput Epididymosomen. Prostatasomen sind allerdings keine apokrin abgeschnürten Vesikel, sondern werden über Diazytose bzw. Exozytose ausgeschleust und besitzen daher eine multilaminare Membran (Brody et al. 1983; Ronquist & Brody 1985).

4.2 Transfer von Membranbestandteilen von Epididymosomen auf Nebenhodenspermien durch *in vitro* Fusion

Um zu untersuchen, ob bovine Nebenhodenspermien mit Epididymosomen fusionieren, wurde in dieser Arbeit die Eigenschaft des Octadecylrhodamin B Chlorid (R18) genutzt (Hoekstra et al. 1984). R18 setzt sich als Dimer in die Lipidmembran, dabei erfolgt eine Selbstauslöschung des Fluoreszenzsignals. Sobald es zur Fusion zwischen beladener und unbeladener Membran kommt, erfolgt ein Anstieg der Fluoreszenz von R18, da die dimeren Farbmoleküle auseinander diffundieren und sich fluoreszierende R18-Monomere bilden (Hoekstra et al. 1984).

In dieser Arbeit wurde mittels fluoreszenzmikroskopischer Analyse und Fluoreszenzmessung bewiesen, dass Epididymosomen am besten im Bereich zwischen pH 5 – 6,5 mit der Spermienmembran fusionieren. Dies entspricht annähernd dem pH-Wert des Nebenhodensekretes (Caput epididymidis: pH 6,48; Cauda epididymidis: 6,85) (Levine & Marsh 1971). Im basischen Bereich von pH 8,0 war keine *in vitro* Fusion mehr messbar. Die in dieser Arbeit untersuchten Interaktionen von Vesikeln des Nebenhodens mit Spermien, bestätigen die Untersuchungen von Yanagimachi et al. (1985), der als Erster am Hamster die Interaktion der Spermatozoenoberfläche mit 0,02 – 0,1 µm großen membranösen Vesikeln im Nebenhodensekret elektronenmikroskopisch darstellte (Yanagimachi et al. 1985). Am ausführlichsten wurde bisher die Fusion von Prostatosomen mit ejakulierten Spermien im männlichen Reproduktionstrakt von Säugetieren untersucht (Arienti et al. 1997a; Arienti et al. 1998; Arienti et al. 1997b; Arienti et al. 1997c; Arienti et al. 1997d). Die Fusionsereignisse von ejakulierten Spermatozoen mit Prostatosomen zeigten in bisherigen Veröffentlichungen ebenfalls eine Abhängigkeit vom pH-Wert und der Zeit (Arienti et al. 1997a) und sind mit den hier erzielten Ergebnissen vergleichbar. Die Fusionsrate lag in der vorliegenden Arbeit im optimalen Fall (pH= 5) bei ca. 31% - 50% und war für Caputspermien höher als für Caudaspermien. Ähnliche Werte konnten auch bei der Fusion von Prostatosomen mit ejakulierten Spermien erzielt werden (pH= 4,5, Fusionsrate: 40%, pH= 5, Fusionsrate: 25%) (Arienti et al. 1997a).

Fluoreszenzmikroskopische Analysen nach *in vitro* Fusion humaner Spermien mit R18-beladenen Prostatasomen dokumentierten, wie auch in dieser Arbeit, einen Anstieg der Fluoreszenz im Bereich des Spermienkopfes, Hals- und Mittelstückes (Arienti et al. 1997a). Interessanterweise ist das Mittelstück von bovinen Caput- und Caudaspermien der Bereich, wo vermehrt der Lipid Raft (Detergenzresistente-Membran-Domain (DRM)) Marker Caveolin (Caveolae) nachgewiesen werden konnte (Post et al. 2010). Es wird postuliert, dass Lipid Rafts oder DRMs an Proteinübertragung (P25b) zwischen Vesikeln und Spermien (Girouard et al. 2009) und an Signaltransduktionen beteiligt sind (Marmor & Julius 2001; Nagafuku et al. 2003; Simons & Ikonen 1997; Simons & Toomre 2000).

Im Gegensatz zu den übrigen Spermien/Vesikelkombinationen konnte in den aktuellen Untersuchungen bei pH 6,5 keine Fusion zwischen Caudaspermien und Caput Epididymosomen fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen werden. Dies kann möglicherweise dadurch begründet sein, dass eine natürliche Sättigung an Membranbestandteilen von Caput Epididymosomen in den Caudaspermien vorlag. Auch bei den vorherigen Messungen im Delta Scan System zeigten die Caudaspermatozoen schlechtere Fusionsraten im Vergleich zu Caputspermien.

Ob die mit Hilfe der R18-Methode ermittelten Fusionsraten der Realität entsprachen muss auch kritisch hinterfragt werden, da verschiedene Faktoren auf die Fluoreszenzmessungen Einfluss nehmen können. Bei der Methode zur Untersuchung der *in vitro* Fusion mittels Octadecylrhodamin B handelt es sich um eine Methode, die von Hoekstra et al. (1984) an Liposomen und an biologischen Membranen (Sendai Virus, Erythrozyten-Ghosts), sowie von Corazzi et al. (1989, 1991) an Liposomen und Mikrosomen aus dem Rattengehirn etabliert wurde. Die Methode wurde dann von Arienti et al. (1997a) für Untersuchungen zur Fusion von Prostatasomen mit Spermien adaptiert. Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuche orientierten sich an die von Arienti etablierte Methode. Bei der Anwendung der R18-Methodik zum Nachweis der *in vitro* Fusion ist zu beachten, dass der Transfer von R18-Molekülen auf unbeladene Membranen und damit der gemessene Fluoreszenzanstieg theoretisch verschiedene Ursachen haben kann. Neben der

Fusion besteht die Möglichkeit der spontanen Diffusion oder des passiven Transfers von R18-Monomeren auf ungeladene Membranen. Dies konnte allerdings von Hoekstra et al. (1984) bei den pH Werten 4,0 – 9,0 nicht nachgewiesen werden. Darüberhinaus ist bei dem Vergleich des Fluoreszenzsignals mit der Fusionswahrscheinlichkeit zweier Membranen nicht zu vernachlässigen, dass ein maximaler theoretischer Fluoreszenzanstieg durch die Fusion nur gemessen werden kann, wenn sich die R18-Moleküle gleichmäßig in der Lipidmembran verteilen können. Dies ist der Fall bei Fusionen zwischen Liposomen (Hoekstra et al. 1984). Bei Spermien erscheint dies schwierig, da die Spermienmembran in ihrer Zusammensetzung viel komplexer ist (Christova et al. 2002). Weiterhin ist bekannt, dass es im Verlauf des Nebenhodens zu einem signifikanten Anstieg der Lipiddiffusion in der Spermienmembran kommt. Untersuchungen an murinen Nebenhodenspermien zeigten zudem, dass große Unterschiede zwischen der Lipiddiffusion in der Plasmamembran des Spermienkopfes und in der Membran des Mittel- und des Hauptstückes bestehen. Die Autorin der Arbeit schließt daher nicht aus, dass mögliche Veränderungen an der Spermienplasmamembran einen Einfluss auf die Einlagerung und die Ausbildung eines Fluoreszenzsignals von R18 haben, wodurch es zu einer Unterschätzung oder Änderung der Fusionsrate kommen kann. Daher sind die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur Fusion zwischen Epididymosomen und der Spermienmembran mittels R18-Methodik auf eine semiquantitative Aussage limitiert, da die absoluten quantitativen Angaben meist unter dem realen Wert liegen und abhängig von den Eigenschaften der Spermienmembran sind.

Die Fusionsergebnisse der Arbeit ließen somit den Schluss zu, dass Nebenhodenspermien *in vivo* mit Epididymosomen fusionieren können. Im Folgenden wurde untersucht, ob sich die Lipidzusammensetzung der Nebenhodenspermienmembran nach *in vitro* Fusion mit Epididymosomen ändert.

4.3 Veränderungen der Lipidzusammensetzung boviner Spermatozoen während der Passage durch den Nebenhoden und nach *in vitro* Fusion mit bovinen Epididymosomen

4.3.1 Lipidzusammensetzung boviner Epididymosomen

Das Cholesterol/ Phospholipid-Verhältnis der Caput Epididymosomen betrug 0,77 und das der Cauda Epididymosomen 0,87, bei einer Abnahme der Cholesterol- und Phospholipidkonzentration von Caput zum Cauda Segment. Wie oben schon erwähnt, zeigt eine aktuelle Publikation von Frenette et al. (2010) zwei verschiedene Populationen von bovinen Cauda Epididymosomen. Dabei wurde festgestellt, dass die elektronen-transparenteren Vesikel ein zweifach höheren Gehalt an Cholesterol besaßen, im Vergleich zu den elektronendichteren Vesikeln (Frenette et al. 2010). Ein Vergleich mit murinen Epididymosomen zeigte, dass diese ein niedrigeres Cholesterol/Phospholipid-Verhältnis aufwiesen, dieses aber ebenfalls von Caput- zu Cauda Epididymosomen anstieg (Caput: 0,26; Cauda: 0,48). Analog zu den bovinen Epididymosomen nahm die Cholesterol- und Phospholipidkonzentration in Maus Epididymosomen im Verlauf des Nebenhodens ab (Rejraji et al. 2006). Anders sieht es bei den Prostatosomen aus. Das Verhältnis von Cholesterol zu Phospholipiden der humanen Prostatosomen betrug 2 (Arvidson et al. 1989) und ist damit viel höher als das der Epididymosomen. Das heißt, Epididymosomen haben im Verhältnis mehr Phospholipide als Cholesterol und Prostatosomen mehr Cholesterol als Phospholipide, wobei die Cholesterolkonzentration (0,46 µM/ mg Protein) der Prostatosomen der in dieser Arbeit gemessenen Cholesterolkonzentration an Cauda Epididymosomen glich (Arvidson et al. 1989).

Weiter ließ sich in der Verteilung der einzelnen Phospholipide kaum Gemeinsamkeiten zwischen murinen und bovinen Epididymosomen finden. Die bovine Epididymosomenmembran der Caput- und Cauda Epididymosomen bestand hauptanteilig aus SM, PC und PE. Aktuellste Untersuchungen an bovinen Cauda Epididymosomen zeigten einen höheren Gehalt an PE, PC und

SM in den elektronentransparenteren Vesikeln (Frenette et al. 2010). Murine Epididymosomen besitzen hingegen hauptanteilig PC und SM, wobei der SM-Gehalt im Verlauf des Nebenhodens stark anstieg und der Gehalt von PI, PE und PC von Caput- zu Cauda Epididymosomen signifikant abnahm (Rejraji et al. 2006). Bei den untersuchten bovinen Epididymosomen konnte innerhalb dieser Arbeit keine signifikante Veränderung der Konzentration einzelner Phospholipid-Klassen von Caput- zu Cauda Epididymosomen nachgewiesen werden.

4.3.2 Wie verändert sich die Lipidzusammensetzung der Nebenhodenspermien im Verlauf der Nebenhodenpassage und nach *in vitro* Fusion mit bovinen Epididymosomen?

Im Folgenden wurde untersucht, ob sich die Lipidzusammensetzung der Spermienmembran entlang der Passage durch den Nebenhoden ändert und ob diese Änderung durch die Fusion mit Epididymosomen verursacht werden kann.

Die Ergebnisse der in dieser Arbeit durchgeführten Versuche belegen, dass die Phospholipidkonzentration in der Spermienmembran im Nebenhodentrakt von Caput zur Cauda konstant blieb. Dies stimmt mit Daten von Wildschweinspermien überein, bei denen ebenfalls eine konstante Phospholipidkonzentration gemessen werden konnte (Nikolopoulou et al. 1985). Poulos et al. (1973) maß eine Verringerung der Phospholipidkonzentration an der bovinen Spermienmembran vom *Hoden* zur *Cauda epididymidis* (Poulos et al. 1973). Daher kann angenommen werden, dass die Phospholipidkonzentrationsreduktion in bovinen Spermien während des Überganges vom Hoden zum *Caput epididymidis* erfolgt. Im Gegensatz dazu wurde in murinen Nebenhodenspermien im Verlauf des Nebenhodentraktes ein Anstieg der Phospholipidkonzentration (Rejraji et al. 2006) und in Rattenspermien eine Abnahme der Phospholipidkonzentration nachgewiesen (Hall et al. 1991).

Die Phospholipide der bovinen Nebenhodenspermien aus dem *Caput epididymidis* setzten sich hauptsächlich aus PE, PC und SM zusammen, wobei

der Gehalt an PE, PC und SM in Caudaspermien signifikant abnahm. Dies wurde ebenfalls an Ziegenbockspermien nachgewiesen (Rana et al. 1991). Auch Wildschweinspermien des Caput Segmentes bestehen hauptanteilig aus PE, PC und SM, wobei auch hier der Gehalt an PE im Verlauf des Nebenhodentraktes abnahm, jedoch die cholinhaltigen Lipide (PC, SM) eher zunahmen (Nikolopoulou et al. 1985). Bei murinen Nebenhodenspermien zeigte sich analog zu Wildschweinspermien ein Anstieg von SM im Verlauf des Nebenhodentraktes (Rejraji et al. 2006). Auch bei Schafen und Ratten wurde hauptanteilig PE und PC in den Nebenhodenspermien nachgewiesen, wobei hier ebenfalls eine Reduktion des PE-Gehaltes im Verlauf des Nebenhodentraktes dokumentiert wurde (Hall et al. 1991; Parks & Hammerstedt 1985). Da ein hoher Gehalt an PE in der Membran zu einer Destabilisierung der Doppelmembran führt (Tilcock & Cullis 1987), postuliert die Autorin dieser Arbeit, dass eine Senkung des PE-Gehaltes in der bovinen Spermienmembran im Verlauf des Nebenhodentraktes zu einer Stabilisierung der Membran beiträgt.

Weiterhin zeigte Poulos et al. (1973) eine Verringerung des PS-Anteils in der bovinen Spermienmembran vom *Hoden* zur *Cauda epididymidis* (Poulos et al. 1973). In dieser Arbeit ging der Gehalt an PS in den Spermienmembranen gegen Null, so dass eine mögliche Veränderung des PS-Gehaltes chromatographisch nicht nachweisbar war.

Obwohl in den durchgeführten Analysen die Gesamtphospholipidkonzentration der bovinen Nebenhodenspermien konstant blieb, nahmen einzelne Phospholipide (PE, PC, SM) bei der Passage der Spermien durch den Nebenhodentrakt signifikant ab. Dies ist auf dem ersten Blick ein Widerspruch, der möglicherweise dadurch begründet sein könnte, dass in der detaillierten Analyse nur ein kleiner Ausschnitt der Gesamtphospholipide abgebildet wurde. So dass die Autorin der Arbeit annimmt, dass noch weitere Phospholipide (PIP, PIP₂, PA, IP₃, DPG) Veränderungen aufwiesen, die auf die Messung der Gesamtkonzentration der Phospholipide Einfluss nahmen.

Außerdem wurde in der vorliegenden Arbeit eine starke Verringerung des Cholesterol-Anteils in den bovinen Nebenhodenspermien vom Caput zum

Cauda Segment gemessen. Eine abnehmende Cholesterolkonzentration wurde ebenfalls in Wildschweinspermien und Rattenspermien während der Passage durch den Nebenhoden detektiert (Hall et al. 1991; Nikolopoulou et al 1985). Parallel dazu nahm die Desmosterol und Cholesterolsulfat Konzentration in den Wildschweinspermien zu (Nikolopoulou et al. 1985). Resultierend aus der Abnahme der Cholesterolkonzentration und der konstanten Gesamtpospholipidkonzentration, wurde in der hier vorliegenden Arbeit eine Abnahme des Cholesterol/ Phospholipid-Verhältnisses von Caput- zu Caudaspermien von 1,1 auf 0,8 errechnet. Ein niedrigeres, aber auch abnehmendes Cholesterol/ Phospholipid-Verhältnis wurde auch für die Rattenspermien dokumentiert (Hall et al. 1991). Im Gegensatz dazu wurde an murinen und Wildschweinspermatozoen bisher keine signifikante Veränderung des Cholesterol/ Phospholipid-Verhältnisses beschrieben (Nikolopoulou et al. 1985; Rejraji et al. 2006). Ein zunehmendes Cholesterol/ Phospholipid-Verhältnis wurde für Nebenhodenspermien von Schafen und Ziegen dokumentiert (Parks & Hammerstedt 1985; Rana et al. 1991).

Aus all diesen Erkenntnissen lässt sich schließen, dass die Veränderung der Lipidzusammensetzung in der Spermienmembran verschiedener Säuger im Verlauf des Nebenhodens zwar einzelne Gemeinsamkeiten aufwiesen, sich aber doch größtenteils unterscheiden.

Die in dieser Arbeit während der Passage durch den Nebenhoden festgestellte Abnahme der Cholesterolkonzentration an bovinen Spermien und die daraus resultierende Veränderung des Cholesterol/ Phospholipid-Verhältnisses, könnte schon die erste Vorbereitung auf die später folgende Kapazitation sein, da für eine schnelle Kapazitation ein niedriges Cholesterol/ Phospholipid-Verhältnis notwendig ist (Hoshi, et al. 1990). *In vitro* Kapazitationen an humanen Spermien zeigten zudem einen abnehmenden Cholesterolgehalt (Zarintash & Cross 1996). Der Sterolgehalt in der Spermienmembran wird außerdem durch den SM-Gehalt in der Spermienmembran beeinflusst (Cross 2000). An humanen Spermien wurde gezeigt, dass wenn SM in der Membran vorliegt der Sterolefflux verringert wird und somit die Kapazitation verlangsamt wird (Cross 2000). Daher könnte auch die hier nachgewiesene signifikante Abnahme des SM-Gehaltes in den Spermien vom Caput- zum Caudasegment mit dem

Cholesterolefflux einhergehen und somit ebenfalls Einfluss auf die später folgende Kapazitation haben. Weiterhin wurde gezeigt, dass der Verlust von Cholesterol zu einer erhöhten Bereitstellung von Rezeptoren für Mannose auf der Spermienoberfläche führen kann. Diese Rezeptoren sollen einen Einfluss auf die Spermien Zona-Pellucida-Interaktion haben (Benoff 1993).

Nach *in vitro* Fusion von Nebenhodenspermien mit Cauda- bzw. Caput Epididymosomen zeigte sich bei den bovinen Caputspermien keine signifikante Änderung der Cholesterolkonzentration. Zwar wurde ein abnehmendes Cholesterol/ Phospholipid-Verhältnis in der Membran der Spermien des *Caput epididymidis* nach der *in vitro* Fusion mit Epididymosomen aus dem Caput- und Caudasegment auf 0,8 gemessen, welches dem Wert unfusionierter Caudaspermien entsprach. Diese Veränderung erfolgte jedoch durch einen leichten signifikanten Anstieg der Phospholipidkonzentration nach *in vitro* Fusion. Bei Caudaspermien konnte ein leichter signifikanter Anstieg der Cholesterolkonzentration nach *in vitro* Fusion mit Epididymosomen festgestellt werden. Interessanterweise wurde von Arienti et al. (1998) behauptet, dass der Cholesterolgehalt nach *in vitro* Fusion von humanen Spermien mit Prostasomen anstieg. Dies wurde als eine Vorsorge gegen eine frühzeitige Akrosomenreaktion interpretiert (Arienti et al. 1998; Arienti et al. 2004).

Das Phospholipidspektrum in der Spermatozoenmembran zeigte nach *in vitro* Fusion kaum Veränderungen, obwohl die Gesamtphospholipidkonzentration nach *in vitro* Fusion angestieg. Nur ein signifikanter leichter Anstieg von PE ließ sich bei *in vitro* fusionierten bovinen Spermatozoen des *Cauda epididymidis* mit Caput Epididymosomen feststellen. Auch hier ist es möglich, dass die Epididymosomen auf weitere, in dieser Arbeit nicht analysierte Phospholipide der Spermienmembran wie PA, PIP, PIP₂ oder IP3 Einfluss hatten.

Abschließend muss festgestellt werden, dass mittels *in vitro* Fusion von Spermien mit Epididymosomen nicht die Lipidveränderungen der *in vivo* Situation erzielt werden konnten. Während *in vivo* die Cholesterolkonzentration von Caput zu Cauda abnahm und die Gesamtphospholipidkonzentration konstant blieb, blieb die Cholesterolkonzentration nach Fusion von Caputspermien mit Epididymosomen konstant und die

Gesamtphospholipidkonzentration nahm zu. Auch bei detaillierter Analyse der Phospholipide ließ sich keine Übereinstimmung zeigen. *In vivo* nahmen die meisten Phospholipide ab, während sie nach *in vitro* Fusion konstant blieben. Diese Unterschiede könnten entweder daraus begründet sein, dass die *in vivo* Situationen nicht durch die *in vitro* Fusion nachgeahmt werden konnte bzw. *in vivo* viele weitere Faktoren entlang der Nebenhodenpassage auf die Reifung der Spermien Einfluss nehmen.

4.4 Wird die Plasmamembran- Ca^{2+} -ATPase von Epididymosomen auf die Spermien übertragen?

In vorausgehenden Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass PMCA4a von Caput- zu Caudaspermien zunahm (Brandenburger et al. 2011). Daher wurde postuliert, dass während der Passage durch den Nebenhoden PMCA4a durch Fusion der Caputspermien mit Cauda Epididymosomen übertragen wird.

4.4.1 Proteinübertragung von Epididymosomen auf die Spermienmembran

Zunächst wurde untersucht, ob Proteine von Epididymosomen auf Spermien übertragen werden können. Proteomische Analysen an humanen Epididymosomen weisen ein weites Spektrum von Proteinen auf, die wichtige physiologische Funktionen im Nebenhoden ausüben. Darunter befinden sich vermehrt Transporterproteine, Proteine zur Signalübertragung, Adhäsionsmoleküle und Enzyme (Thimon et al. 2008). Proteomische Analysen an bovinen Epididymosomen zeigten, dass sich die Epididymosomen der verschiedenen Nebenhodenabschnitte in ihrer Proteinzusammensetzung unterscheiden (Frenette et al. 2006a). Desweiteren zeigte sich in dieser Arbeit ein unterschiedliches Proteinspektrum von Caput- zu Caudaspermien in Coomassie-Blau gefärbten SDS-Gelen. Daher postuliert die Autorin dieser Arbeit, dass die Epididymosomen durch Fusion mit der Spermienoberfläche zur Änderung des Proteinspektrums der Spermien im Nebenhoden beitragen.

Um dies zu überprüfen wurden Epididymosomen nach den Angaben von Frenette et al. (2006a) mit Biotin markiert. Nach Fusion von Biotin-markierten Epididymosomen mit unmarkierten Spermien wurde im Rahmen dieser Arbeit vorherige Untersuchungen bestätigt, die eine selektive Proteinübertragung zwischen Epididymosomen und Spermien unabhängig der Herkunft aus dem Nebenhodenabschnitt dokumentierten (Frenette et al. 2002; Frenette et al. 2006a). Immunzytochemische Analysen dieser und vorrangigere Untersuchungen zeigten eine Übertragung von Biotin-markierten Proteinen im postakrosomalen Bereich, als auch im Hals- und Mittelstück des Spermischwanzes (Frenette et al. 2002). Diese Ergebnisse glichen dem der R18-Analyse. Das spricht dafür, dass möglicherweise eine Proteinübertragung, als auch eine Übertragung von Membranbestandteilen an gleichen Regionen stattfand. Desweiteren wurde mittels Westernblot-Analyse gezeigt, dass vermehrt Biotin-markierte Proteine mit einer Größe von 130 kDa, zwischen 100 kDa - 72 kDa und ~55 kDa auf die Nebenhodenspermien durch *in vitro* Fusion mit Epididymosomen das Caput und des Cauda Segmentes übertragen wurden. Die Bande im Bereich von 130 kDa könnte möglicherweise auf PMCA hindeuten. Die Publikation von Frenette et al. (2006a) zeigte mittels Westernblot-Analyse eine Proteinübertragung hauptsächlich im Bereich um 28 kDa – 34 kDa (Frenette et al. 2006a).

Bisher nachgewiesene Proteine, die mittels *in vitro* Fusion von Epididymosomen auf Spermatozoen übertragen wurden sind ADAM7 (108 kDa) und P25b (25 kDa) (Frenette & Sullivan 2001; Oh et al. 2009). Außerdem wird eine Übertragung weiterer mit Epididymosomen assoziierter Proteine (MIF (12,5 kDa), GPX5 (24 kDa), SPAM1 (64 kDa), CD52/HE5 (21 – 28 kDa) auf die Spermien diskutiert (Deng, et al. 2000; Eickhoff, et al. 2001; Kirchhoff et al. 1996, Rejraji et al. 2002). Fusionsassays mit Prostatasomen bewiesen bisher einen Proteintransfer von CD13 und CD26 von Prostatasomen auf ejakulierte Spermien (Arienti et al. 1997b; Arienti et al. 1997d).

4.4.2 Übertragung der Plasmamembran- Ca^{2+} -ATPase auf die Spermienmembran

In einem zweiten Schritt wurde analysiert, ob es zu einer Lokalisationsänderung der PMCA4 bzw. PMCA4a durch Fusion von Spermien mit Epididymosomen in der Spermienmembran kommt, und ob dies mit einer Änderung in der Ca^{2+} -ATPase-Aktivität einhergeht. Dazu wurden zunächst die Epididymosomen und die Nebenhodenspermien aus den unterschiedlichen Nebenhodenabschnitten (Caput, Cauda) separat untersucht und im Anschluss die Nebenhodenspermien nach *in vitro* Fusion analysiert.

Anhand von Westernblot-Analysen wurde gezeigt, dass in Epididymosomen aus dem *Caput*- und der *Cauda epididymidis* die Plasmamembran Ca^{2+} -ATPase (5F10) und unterschiedliche Spleißvarianten der PMCA4 (JA9) vorhanden waren. In den Epididymosomen des Caput Segmentes kam es zu einer Anhäufung von anti-PMCA (5F10) und anti-PMCA4 (JA9) positiven Banden oberhalb von 130 kDa. Epididymosomen des Cauda Segmentes zeigten hingegen eine Bande bei ~130 kDa. So dass es wahrscheinlich ist, dass in den Cauda Epididymosomen vermehrt PMCA4a vorkommt. PMCA4a besitzt etwa eine Größe von 128 kDa, die Größe der PMCA4b liegt bei etwa 133 kDa (Carafoli 1992; Caride et al. 1996). Mittels der Westernblot-Analyse mit einem Antikörper gegen PMCA4a konnte diese Vermutung des PMCA4-Blots bestätigt werden. Caput Epididymosomen zeigten im Gegensatz zu Cauda Epididymosomen im Westernblot eine schwächere Bande. Diese Ergebnisse sind mit früheren Untersuchungen der Arbeitsgruppe im Einklang. Dabei wurde im Rattennebenhoden mittels PCR nachgewiesen, dass PMCA4b mRNA vermehrt im Bereich des *Caput epididymidis* transkribiert ist. Die Transkription von PMCA4a mRNA nimmt zur *Cauda epididymidis* zu, so dass dort gleiche Mengen PMCA4a und PMCA4b nachweisbar waren (Wilhelm et al. 2008). In der RT-PCR vom bovinen Nebenhoden zeigte sich ein deutlicher Switch von PMCA4b im Caputsegment zu PMCA4a im Caudasegment. Immunhistologische Untersuchungen des bovinen Nebenhodenschwanzepithels belegten, dass PMCA4a an der apikalen Membran des Nebenhodenepithels lokalisiert ist (Brandenburger et al. 2011), von der die Abschnürung der Aposomen erfolgt. Die Westernblot-Analysen mit

Antikörpern gegen PMCA und PMCA4 in dieser Arbeit zeigten darüberhinaus eine weitere Bande unterhalb von 128 kDa. Diese Bande stellt möglicherweise ein Spleiß-Artefakt oder ein Abbauprodukt dar.

Mittels der hier durchgeführten immunzytochemischen Analysen wurde PMCA und PMCA4 in Caput- und Caudaspermien im Bereich des Hals-, und Mittelstückes des bovinen Spermenschwanzes lokalisiert. Diese immunhistologischen Ergebnisse wurden bereits in einer Veröffentlichung unserer Arbeitsgruppe publiziert (Post et al. 2010), in der die Autorin dieser Arbeit Co-Autor ist. Diese Ergebnisse bestätigen vorangegangene Untersuchungen, bei denen PMCA nach Zellfraktionierung im Spermenschwanz boviner Caudaspermien detektiert werden konnte (Triphan et al. 2007). In murinen Caudaspermien wurde PMCA und PMCA4 im Hauptstück lokalisiert (Okunade et al. 2004; Wennemuth et al. 2003). Allerdings konnte PMCA4 auch schwach im Mittelstück muriner Nebenhodenspermien detektiert werden (Okunade et al. 2004). In Rattennebenhodenspermien aus dem Caput und Cauda Segment wurde PMCA und PMCA4 im Bereich des Hauptstückes und PMCA zusätzlich schwach im Bereich des Mittelstückes lokalisiert (Wilhelm et al. 2008). Dies spricht dafür, dass es sich im Bereich des Mittelstückes der Rattennebenhodenspermien um eine andere Isoform (1 - 3) handeln muss. Nach *in vitro* Fusion der Caputspermien mit Cauda Epididymosomen konnte in dieser Arbeit ein leichter Fluoreszenzanstieg mit dem Antikörper gegen PMCA4 im Bereich des Hals- und Mittelstückes beobachtet werden. Dies könnte auf eine Übertragung der PMCA4 von Epididymosomen auf die Nebenhodenspermien hindeuten.

PMCA4a konnte punktuell im Bereich des Hals- und Hauptstückes und deutlich am Akrosom in Caput-, als auch in Caudaspermien detektiert werden. Die starke Fluoreszenz am Akrosom ist vermutlich eine unspezifische Bindung des polyklonalen PMCA4a Antikörpers, da keine Bindung des monoklonalen PMCA4 Antikörpers (JA9) in diesem Bereich nachgewiesen werden konnte. Zudem ist bekannt, dass polyklonale Antikörper oft unspezifisch im Bereich des Akrosoms reagieren (persönliche Mitteilung von Prof. Dr. Stefan Schlatt, Institut für Reproduktionsmedizin Münster (IRM)). Triphan et al. (2007) konnten darüber hinaus nach Spermienfraktionierung in Kopf und Schwanz in der Westernblot-Analyse keine PMCA in den Kopffractionen nachweisen (Triphan

et al. 2007). Daher geht die Autorin der Arbeit von einer unspezifischen Reaktion des polyklonalen Antikörpers gegen PMAC4a im Bereich des Akrosoms aus. Die schwache Detektion des Antikörpers gegen PMCA4a im Spermienausstrich resultiert möglicherweise daraus, dass der Antikörper im immunzytochemischen Nachweis bzw. auf Spermienausstrichen nur schwach funktioniert. Weiterhin konnten vor und nach der *in vitro* Fusion keine Unterschiede in der Fluoreszenzintensität, noch in der Lokalisation festgestellt werden, was wiederum auf die schlechte Detektion des PMCA4a Antikörpers im Spermienausstrich zurückzuführen wäre.

Neben dem Nachweis der PMCA mittels Westernblot und Immunzytochemie wurde auch die Ca^{2+} -ATPase-Aktivität in die Untersuchung mit einbezogen. In Epididymosomen und Spermien konnte sowohl die Mg^{2+} -abhängige Ca^{2+} -ATPase, als auch die Mg^{2+} -unabhängige Ca^{2+} -ATPase-Aktivität gemessen werden.

Beide ATPase-Aktivitäten wurden bereits in Ziegenspermien des Nebenhodenschwanzes (Sikdar et al. 1991), in der Rattenkoagulationsdrüse, im Rattenkoagulationsdrüsensekret (Post et al. 2002), im Rattenhoden (NagDas et al. 1988), in Rattennebenhodenspermien (Sanchez-Luengo et al. 2004; Wilhelm et al. 2008) und in bovinen Nebenhodenspermien (Sanchez-Luengo et al. 2004; Triphan et al. 2007) gemessen. Ronquist (1987) maß die Mg^{2+} -abhängige Ca^{2+} -ATPase-Aktivität in Prostatasomen, die durch La^{3+} und Calmidazolium gehemmt werden konnte und somit Merkmale der PMCA aufwies (Ronquist 1987). Die Mg^{2+} -unabhängige Ca^{2+} -ATPase wurde bereits im Sekret und in Vesikeln der bovinen Bläschendrüse (Agrawal & Vanha-Perttula 1987), sowie in ejakulierten Bullenspermien (Vijayasarathy, et al. 1980) im Hoden, im Nebenhoden und in der Prostata adulter Affen dokumentiert (Vanithakumari & Govindarajulu 1985).

In der vorliegenden Arbeit konnte eine höhere Aktivität der Mg^{2+} -unabhängigen Ca^{2+} -ATPase im Vergleich zur Mg^{2+} -abhängigen Ca^{2+} -ATPase in bovinen Epididymosomen und Nebenhodenspermien gemessen werden. Ebenfalls wurde bereits in Ziegenspermien, in der Rattenkoagulationsdrüse, im Rattenhoden und in den Rattennebenhodenspermien eine deutlich höhere Aktivität der Mg^{2+} -unabhängigen Ca^{2+} -ATPase im Vergleich zur Mg^{2+} -

abhängigen Ca^{2+} -ATPase gemessen (NagDas et al. 1988; Sikdar et al. 1991; Post et al. 2002, Wilhelm et al. 2008). Hingegen zeigten Untersuchungen von Sanchez-Luengo et al. (2004) und Triphan et al. (2008) an bovinen Nebenhodenspermien eine deutlich niedrigere Aktivität der Mg^{2+} -unabhängigen Ca^{2+} -ATPase im Vergleich zur Mg^{2+} -abhängigen Ca^{2+} -ATPase (Sanchez-Luengo et al. 2004; Triphan et al. 2008). Der Grund dafür könnte sein, dass die Aufreinigung der Spermien in der vorliegenden Arbeit über einen Dichtegradienten erfolgte, so dass keine Erythrozytenverunreinigung in der Spermienfraktion vorhanden war. Auch wenn sich die absoluten Werte unterschieden, wurde eine signifikante Erhöhung der ATPase-Aktivität von Caput zu Caudaspermien durch die Untersuchungen von Sanchez-Luengo et al (2004) bestätigt. In Rattennebenhodenspermien wurde neben einer Zunahme der Mg^{2+} -abhängigen Ca^{2+} -ATPase-Aktivität von Caput zum Cauda-Segment, eine Abnahme der Mg^{2+} -unabhängigen Ca^{2+} -ATPase-Aktivität dokumentiert (Wilhelm et al. 2008). Somit zeigten sich in den Nebenhodenspermien verschiedener Spezies Unterschiede in der Lokalisation der PMCA und der PMCA4, sowie Unterschiede in der Ca^{2+} -ATPase-Aktivität im Verlauf der Nebenhodenpassage.

Aus früheren Untersuchungen der Arbeitsgruppe war bekannt, dass die Ca^{2+} -ATPase-Aktivität in Bullenspermien durch PDC-109 stimuliert werden kann (Sanchez-Luengo et al. 2004, Triphan et al. 2008). Deshalb wurde auch hier die Wirkung von PDC-109 auf die Ca^{2+} -ATPase untersucht. Nach Zugabe von PDC-109 kam es ebenfalls zu einem signifikanten Anstieg der Mg^{2+} -abhängigen und Mg^{2+} -unabhängigen Ca^{2+} -ATPase-Aktivität in Caput und Caudaspermien, aber auch in Epididymosomen (Caput, Cauda). Es zeigte sich, dass die Zunahme der Mg^{2+} -abhängigen Ca^{2+} -ATPase-Aktivität durch PDC-109 Stimulation höher war, als bei der Mg^{2+} -unabhängigen Ca^{2+} -ATPase-Aktivität. Die Aktivitätserhöhung war in den Caput Epididymosomen und Spermien prozentual höher als in den Cauda Epididymosomen und Spermien. Hingegen zeigten bereits veröffentlichte Messungen eher eine höhere prozentuale Zunahme der ATPase-Aktivität in Caudaspermien nach PDC-109 Stimulation im Vergleich zur ATPase-Aktivität in Caputspermien (Sanchez-Luengo et al. 2004). Grund dafür könnte wiederum sein, dass die Aufreinigung der Spermien in der

vorliegenden Arbeit über einen Dichtegradienten und die ATPase-Aktivitätsmessung an ganzen Spermien erfolgte.

Festzuhalten bleibt, dass die gemessene Ca^{2+} -ATPase-Aktivität nicht ausschließlich der Aktivität der PMCA entsprechen muss, da noch andere ATPasen (SERCA, Na^{2+} - Ca^{2+} -Austauscher) existieren können. Allerdings wurde an Mausspermien gezeigt, dass die Plasmamembran- Ca^{2+} -ATPase (PMCA) der Spermien hauptverantwortlich für die Ca^{2+} -Homöostase ist und somit die Hauptaktivität leistet (Wennemuth, et al. 2003). Außerdem deuten Analysen an Membranfraktionen boviner Spermischwänze darauf hin, dass keine SERCA in diesen Membranfraktionen vorhanden ist, da die Ca^{2+} -ATPase-Aktivität nach Behandlung mit dem SERCA-Hemmer Thapsigargin (Guerini 1998) unverändert blieb (Triphan et al. 2007). Auch gibt es bislang keine Daten, ob die Mg^{2+} -abhängige und die -unabhängige Ca^{2+} -ATPase zwei unterschiedliche Enzyme sind oder ob sie ein Enzym mit gleichen oder unterschiedlichen katalytischen Domänen sind (Sikdar et al. 1993).

Nach der *in vitro* Fusion der Spermien mit Nebenhodenvesikeln wurde ein signifikanter Anstieg der Enzymaktivität der Mg^{2+} -abhängigen und -unabhängigen Ca^{2+} -ATPase bei Caputspermatozoen nach *in vitro* Fusion mit Vesikeln des *Caput*- und der *Cauda epididymidis* zur Ausgangsaktivität gemessen. Die ATPase-Aktivität der *in vitro* fusionierten Caputspermien entsprach annähernd dem Wert der unfusionierten Caudaspermien, so dass vermutet werden kann, dass die Epididymosomen für die Steigerung der ATPase-Aktivität im Verlauf des Nebenhodentraktes mit verantwortlich sind. Eine signifikante Erhöhung der Mg^{2+} -abhängigen Ca^{2+} -ATPase-Aktivität konnte auch bei den *in vitro* fusionierten Caudaspermien mit Caput Epididymosomen gemessen werden. Hingegen wurde bei den *in vitro* fusionierte Caudaspermien mit Cauda Epididymosomen keine signifikante Erhöhung der Ca^{2+} -ATPase-Aktivität nachgewiesen.

In Caputspermien zeigte die Wirkung des sekretorischen Proteins PDC-109 auf die ATPase-Aktivität nach *in vitro* Fusion eine prozentual niedrigere Aktivitätserhöhung, im Vergleich zu den Caput Spermatozoen ohne *in vitro* Fusion. Dies ist vergleichbar mit der *in vivo* Situation, bei der die Ca^{2+} -ATPase-

Aktivität der Caudaspermien prozentual geringer stimuliert wurde, als die ATPase-Aktivität der Caputspermien. Im Gegensatz dazu zeigte die Ca^{2+} -ATPase-Aktivität bei den *in vitro* fusionierten Caudaspermien durch PDC-109 eine erhöhte Stimulation zu den unfusionierten Caudaspermien. Welchen Einfluss PDC-109 auf unreife Nebenhodenspermien hat, ist bisher ungewiss. Und wird später in der Diskussion analysiert (Kap. 4.5, S. 94f).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass über *in vitro* Fusion der Epididymosomen mit Spermien Veränderungen an der Spermienplasmamembran erfolgen, die die Ca^{2+} -ATPase-Aktivität in Caputspermien erhöhen und dabei die relative Stimulation der ATPase-Aktivität mittels PDC-109 beeinflussen, so dass es vergleichbar mit der *in vivo* Situation ist. Ob diese Aktivitätsveränderungen etwas mit der Übertragung von PMCA4 bzw. PMCA4a Splicevarianten zu tun hat, kann abschließend hier nicht beantwortet werden, auch wenn auf Spermienausstrichen eine leichte Zunahme der Fluoreszenzintensität von PMCA4 beobachtet werden konnte.

4.4.3 Physiologische Bedeutung der PMCA4 Spleißvarianten in bovinen Epididymosomen und Spermien

Damit Spermien eine Eizelle befruchten können, müssen sie motil sein und die Fähigkeit zur Kapazitation und Akrosomenreaktion besitzen. Diese Prozesse werden durch die intrazelluläre Kalziumkonzentration der Spermien reguliert (Breitbart et al. 1984; Breitbart et al. 1985; Breitbart & Naor 1999; Williams & Ford 2003). Wichtig für die Homöostase der intrazellulären Kalziumkonzentration sind die Ca^{2+} -ATPasen (Wennemuth et al. 2003). Über knock-out Mäuse konnte gezeigt werden, dass die Isoform PMCA4 ein wichtiger Faktor für die Fertilität der Spermien ist (Okunade, et al. 2004; Schuh et al. 2004). Dabei macht PMCA4 90% aller PMCA's in den Spermien aus (Okunade et al. 2004). In der vorliegenden Arbeit konnte im Westernblot mehr PMCA4a in Cauda Epididymosomen im Vergleich zu Caput Epididymosomen nachgewiesen werden. Diese Verteilung der PMCA4 Spleißvarianten wurde vorher in bovinen Nebenhodenspermien beobachtet (Brandenburger et al. 2011). Welche funktionellen Konsequenzen sich daraus ableiten lassen, war die Frage die nun zu beantworten gilt.

Strukturelle Unterschiede die durch das Spleißen am COOH-Ende (Spleißstelle C) der PMCA4 entstehen, führen zu funktionellen Unterschieden. Die Inklusion des Exons bei PMCA4a an der Spleißstelle C verändert die C-terminale Hälfte der Calmodulin Bindungsdomäne und verändert den Leserahmen des C-terminalen Schwanzes. Daraus resultiert ein veränderter Bindungs- und Aktivierungsmechanismus von PMCA4a durch Calmodulin im Vergleich zu PMCA4b (Caride et al. 1999; Caride et al. 2007; Preiano et al. 1996). PMCA4a besitzt eine niedrigere Bindungsaffinität zu Calmodulin ($K_d \sim 53 \text{ nM}$) im Vergleich zu PMCA4b ($K_d \sim 7,6 \text{ nM}$) (Caride et al. 1999; Preiano et al. 1996). In diesem Zusammenhang erfolgt die Aktivierung und Inaktivierung der PMCA4a nach Calmodulin Zugabe bzw. Entfernung schneller als bei der PMCA4b (Caride et al. 1999, Caride et al. 2007). Eine höhere Grundaktivität der PMCA4a als Folge einer geringeren Autoinhibition im Vergleich zur PMCA4b ermöglicht es, die intrazelluläre Kalziumkonzentration nach einem Ca^{2+} -Anstieg schneller wieder auf die Ausgangskonzentration zu senken. Die physiologische Wichtigkeit durch die Zunahme des Enzyms PMCA4a von Caput- zu Caudaspermien während der Reifung im Nebenhoden, könnte einen erhöhten Kalziumausstoß aus den Caudaspermien ermöglichen und somit eine wichtige Grundvoraussetzung für die Versetzung des Spermiums in den hyperaktivierten Zustand sein (Brandenburger et al. 2011).

Im Gegensatz zur PMCA4a besitzt die Isoform 4b ein Konsensus-Motiv für die Interaktion mit PDZ-Domänen-Proteinen. Diese Interaktion ist wahrscheinlich auf die „b“ Spleißvarianten beschränkt. (DeMarco & Strehler 2001; Kim et al. 1998). PMCA4b kann über dieses Motiv mit mehreren Proteinen der MAGUK-Familie interagieren. Die MAGUKs wirken als Gerüst für die Bildung von Komplexen, die Membranproteine und Signalwege miteinander verknüpfen (Kim et al. 1995; Anderson 1996). Die funktionelle Bedeutung einer möglichen Interaktion der PMCA4b mit PDZ-Domänen-Proteinen in Nebenhodenspermien ist bis heute nicht untersucht.

Zusammenfassend ist es schwierig die Funktion der verschiedenen Spleißvarianten in Epididymosomen und Spermien zu interpretieren, da einerseits die Variante 4b die Fähigkeit hat an PDZ-Domänen-Proteine zu

binden und andererseits PMCA4a eine stärkere Aktivierung durch Calmodulin erfährt. Ob diese Veränderung der PMCA-Ausstattung in der Spermienmembran mittels Übertragung von Epididymosomen stattfindet ist schwierig zu analysieren, da auch die entsprechenden Assay's zur Messung der Aktivität zu unspezifisch sind. Weiter Forschungen werden nötig sein, um eine Übertragung von PMCA Isoformen nachzuweisen und ihre Funktionalität für die spätere Fertilität der Spermien zu überprüfen.

4.5 Besteht ein funktioneller Zusammenhang zwischen der Ca^{2+} -ATPase-Aktivität und der Lipidzusammensetzung boviner Epididymosomen und Spermien?

In der vorliegenden Arbeit konnten Änderungen der Ca^{2+} -ATPase-Aktivität und der Lipidzusammensetzung in Epididymosomen, in unfusionierten und in *in vitro* fusionierten Spermien festgestellt werden. Da außerdem die Ca^{2+} -ATPase-Aktivität durch PDC-109 stimuliert werden konnte und bekannt ist, dass PDC-109 an PC und SM bindet, stellt sich nun die Frage, ob ein Zusammenhang zwischen der Ca^{2+} -ATPase-Aktivität und der Lipidumgebung in den Epididymosomen und den Spermien besteht.

Im Ruhezustand liegt die Affinität der Ca^{2+} -ATPase/PMCA für Kalzium bei einem $K_m > 10 \mu\text{M}$ (Niggli et al. 1981), so dass sie bei einer physiologischen Kalziumkonzentration inaktiv ist. Daher werden spezielle Mechanismen benötigt, die die Ca^{2+} -Affinität beeinflussen. Neben dem bereits erwähnten Calmodulin nimmt z.B. die Lipidumgebung Einfluss auf die Aktivität. Saure Phospholipide (Bsp. PS, PI, PA) und PUFA können mit der CaM-BD und der PL-Region der PMCA interagieren (Brodin et al. 1992; Zvaritch et al. 1990), deren Ca^{2+} -Affinität steigern (Missiaen et al. 1989) und die Mg^{2+} -abhängige Ca^{2+} -ATPase um das 3 – 4 fache stimulieren (Brodin et al. 1992). PI in niedriger Konzentration ($< 20\%$) kann auch zu einer Abnahme Ca^{2+} -Affinität der PMCA führen (Missiaen et al. 1989). Die Stimulation der Ca^{2+} -ATPase erfolgt dabei unabhängig von Calmodulin (Enyedi et al. 1987).

Sowohl Epididymosomen als auch Spermien des *Cauda epididymidis* wiesen eine höhere Ca^{2+} -ATPase-Aktivität auf, als Epididymosomen und Spermien aus dem Nebenhodenkopf. Ein Vergleich der Lipidzusammensetzung zeigte, dass sowohl die Caputspermien als auch Caput Epididymosomen einen höheren Cholesterolgehalt besitzen, als die Keimzellen und Vesikel des Nebenhodenschwanzes. Anders sah es bei den Gesamtpospholipiden, den einzelnen Phospholipiden und dem Cholesterol/ Phospholipid-Verhältnis aus. Hier gab es keine Gemeinsamkeiten in der Veränderung zwischen Epididymosomen des Nebenhodenkopfes und -schwanzes und Spermien des Nebenhodenkopfes und -schwanzes. Da Studien an PC-Liposomen eine Abnahme der PMCA-Aktivität bei steigendem SM-CHOL-Gehalt beschrieben, (Pang et al. 2005), könnte die in dieser Arbeit nachgewiesene Abnahme der Cholesterol- und SM-Konzentration in der Spermien- und Epididymosomenmembran deren ATPase-Aktivität beeinflussen.

Ein Zusammenhang eines möglichen Einflusses saurer Phospholipide (PS, PA, PI, PIP₂), sowie PUFAs auf die hier gemessene ATPase-Aktivität konnte in diesen Untersuchung nicht abgeleitet werden, da sich keine signifikanten Veränderungen in der PS- und PI-Konzentration, weder bei Epididymosomen, noch Spermien (vor/ nach *in vitro* Fusion) zeigten. Allerdings kann über den Gehalt an PA, PIP₂ und PUFA keine Aussage getroffen werden, da diese Lipide nicht untersucht wurden und daher ein möglicher Einfluss auf die ATPase-Aktivität nicht ausgeschlossen werden kann. Neutrale Lipide, wie PE und PC hatten nachweislich in bisherigen Untersuchungen keinen Einfluss auf die Mg^{2+} -abhängigen Ca^{2+} -ATPasen (Ronner et al. 1977; Niggli et al. 1981). Nicht zu vernachlässigen ist, dass in den hier dargestellten Untersuchungen auf das gesamte Membransystem der Spermien eingegangen wurde. Eine genaue Untersuchung der Lipidumgebung von PMCA bzw. der ATPasen konnte hier nicht analysiert werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde weiterhin gezeigt, dass die Ca^{2+} -ATPase-Aktivität in Epididymosomen und Spermien durch PDC-109 stimuliert werden konnte. Die relative Aktivitätserhöhung der ATPase durch PDC-109 war in Caput Epididymosomen und Caputspermien höher als in Caudaspermien und Cauda Epididymosomen. Wie eingangs erwähnt bindet PDC-109 an SM und

PC (Desnoyers & Manjunath 1992; Muller et al. 1998; Post et al. 2010; Ramakrishnan et al. 2001; Therien et al. 1995), wobei auch eine Reduktion der Bindung von PDC-109 durch Einlagerung von PE oder PS in PC-Vesikeln nachgewiesen wurde (Muller et al. 1998). Ein Vergleich der Veränderungen von SM und PC in der Membran von Nebenhodenkopf und Nebenhodenschwanz Epididymosomen bzw. Nebenhodenkopf und Nebenhodenschwanz Spermien zeigte, dass der Gehalt an PC und SM in Caput Epididymosomen, wenn auch nicht signifikant, höher war und in Caputspermien signifikant höher war. Der Gehalt an PE war in Caputspermien signifikant höher im Vergleich zu Caudaspermien. Bei Epididymosomen konnte keine Veränderung des PE-Gehaltes nachgewiesen werden. Nach *in vitro* Fusion der Caputspermien mit Epididymosomen war die relative Aktivierung der ATPase durch PDC-109 geringer als bei unfusionierten Spermien, obwohl es nach Fusion keine messbaren Veränderungen im SM- PC- und PE-Gehalt gab. Bei Caudaspermien war die relative Aktivierung nach *in vitro* Fusion mit Cauda Epididymosomen erhöht, wobei keine Veränderungen in der Phospholipidzusammensetzung nach *in vitro* Fusion messbar waren. Die Caudaspermien zeigten nach *in vitro* Fusion mit Caput Vesikeln eine niedrigere relative Aktivierung der Mg^{2+} -abhängigen Ca^{2+} -ATPase und eine erhöhte relative Aktivierung der Mg^{2+} -unabhängigen Ca^{2+} -ATPase nach PDC-109 Stimulation, im Vergleich zu den unfusionierten Caudaspermien. Nach *in vitro* Fusion der Caudaspermien mit Caput Epididymosomen wurde eine geringe signifikante Erhöhung des Gehaltes an PE gemessen. Die Mechanismen, wie PDC-109 und die Ca^{2+} -ATPase miteinander interagieren ist nicht genau bekannt. Mittels Proteinoverlay-Untersuchungen mit PDC-109 auf, im SDS-Gel aufgetrennte und auf PVDF-Membran übertragene Spermienmembranproteinen, konnte kein direkter Interaktionspartner identifiziert werden (unveröffentlichte Daten Wilhelm). Post et al. (2010) konnte an Membranfraktionierungsexperimenten belegen, dass PDC-109 zwar an DRMs bindet, die Stimulierung der Ca^{2+} -ATPase durch PDC-109 erfolgte jedoch insbesondere in den DS-Fractionen (Post et al. 2010). Diese und die in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse lassen daher den Schluss zu, dass die Bindung von PDC-109 an die Phospholipide nicht direkt mit der Aktivierung der ATPase durch PDC-109 in Zusammenhang gebracht werden kann. Post et al. (2010) postuliert dahingehend einen möglichen Link oder Interaktionspartner

zwischen PDC-109 und Mg^{2+} -abhängiger Ca^{2+} -ATPase, welcher die Aktivität von PDC-109 auf die Ca^{2+} -ATPase-Aktivität über die Lipidmembranregion vermittelt. Weitere Untersuchungen werden nötig sein, um diesen Interaktionspartner zu identifizieren.

5 Zusammenfassung

Bei der Passage durch den männlichen Reproduktionstrakt interagieren Spermatozoen mit Faktoren, die u.a. vom Nebenhoden sezerniert werden. Die daraus resultierende Modifikation der Spermatozoen ist essentiell für die Ausreifung zu voll funktionsfähigen Keimzellen. Bei der Ausdifferenzierung im Nebenhoden spielen vermutlich u. a. auch die Epididymosomen (apokrin sekretierte Nebenhodenvesikel) eine wichtige Rolle. In vorausgehenden Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass sich die Plasmamembran- Ca^{2+} -ATPase Isoform 4 (PMCA4) Spleißvarianten-Ausstattung in der Membran von Bullenspermien von PMCA4b in Caputspermien zu PMCA4a in Caudaspermien ändert. Zudem nahm auch die Ca^{2+} -ATPase Aktivität der Spermien während der Passage durch den Nebenhoden signifikant zu. Die Möglichkeit eines Transfers der PMCA4a von Epididymosomen auf Spermien wurde postuliert (Sanchez-Luengo et al. 2004, Brandenburger et al. 2011).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die fusogene Eigenschaft boviner Epididymosomen näher zu untersuchen. Dafür wurden Nebenhodenvesikel aus den verschiedenen Nebenhodenabschnitten isoliert und sowohl morphologisch, als auch biochemisch charakterisiert. Weiterhin wurde der vesikuläre Transfer von Membrankomponenten (Lipide, Proteine) und speziell der potentielle Transfer der PMCA auf bovine Nebenhodenspermien untersucht.

Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten, dass Cauda Epididymosomen größer sind als Caput Epididymosomen. Lipidanalysen von Caput- und Cauda Epididymosomen belegten eine Zunahme des Cholesterin/Phospholipid-Verhältnisses bei einer Abnahme der Cholesterol- und der Phospholipidkonzentration. Hauptanteilig konnten die Phospholipide Phosphatidylethanolamin (PE), Phosphatidylcholin (PC) und Sphingomyelin (SM) nachgewiesen werden, wobei sich der Gehalt in Caput- und Cauda Epididymosomen nicht signifikant veränderte. Bei der Proteinanalyse spezialisierte sich die Autorin auf die PMCA. Mittels Westernblot-Analysen konnte gezeigt werden, dass in Cauda Vesikeln mehr PMCA4a nachzuweisen war als in Caput Vesikeln. Auch die Ca^{2+} -ATPase Aktivität stieg von Caput- zu Cauda Epididymosomen signifikant an.

Um in *in vitro* Experimenten die fusogene Eigenschaft der Epididymosomen mit Spermien zu untersuchen, wurden bovine Epididymosomen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Octadecylrhodamin B (R18) markiert. Für Caputspermien konnte eine höhere Fusionsrate als für Caudaspermien nachgewiesen werden. Der für die Fusion optimale pH lag dabei im sauren Bereich (pH 5 - 6). Lipidanalysen von Nebenhodenspermien belegten eine Abnahme des Cholesterin/Phospholipid-Verhältnisses von Caput- zu Caudaspermien. Dies konnte auch nach *in vitro* Fusion von Caputspermien mit Epididymosomen erzielt werden. Daher wird postuliert, dass diese Veränderungen ein Ergebnis aus der Interaktion der Spermien mit den Epididymosomen sind. *In vivo* konnte in Spermien eine Abnahme von PE, PC und SM im Verlauf des Nebenhodentraktes dokumentiert werden, die jedoch *in vitro* nicht nachgeahmt werden konnte. Nach Markierung der Epididymosomen mit Biotin konnte eine Übertragung Biotin-markierter Proteine von Epididymosomen auf die Nebenhodenspermienmembran mittels *in vitro* Fusion gezeigt werden. Die Ca^{2+} -ATPase-Aktivität nahm zwar signifikant nach *in vitro* Fusion von Epididymosomen mit Nebenhodenspermien zu, ob aber auch die PMCA4a übertragen wird, konnte mittels Immunhistologie nicht abschließend geklärt werden, da der Antikörper gegen die Spleißvariante PMCA4a auf Spermienausstrichen unzureichend färbte. Lediglich mit dem Antikörper gegen PMCA4 konnte eine leichte Fluoreszenzzunahme im Mittelstück dokumentiert werden, die auf eine Übertragung hindeuten könnte. Weiterhin konnte in vorausgehenden Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass die Ca^{2+} -ATPase Aktivität in Nebenhodenspermien organspezifisch (z.B. keine signifikante Stimulation in Herz und Niere) durch das Bläschendrüsensprotein PDC-109 signifikant stimuliert werden kann (Sanchez-Luengo et al. 2004). Diese Stimulation konnte in der vorliegenden Arbeit auch für Epididymosomen und Spermien nach *in vitro* Fusion dokumentiert werden. Es ist bekannt, dass PDC-109 an Phospholipide bindet und auch die Aktivität der PMCA durch Phospholipide beeinflusst werden kann. Weitere Untersuchungen müssen zeigen, ob es einen Zusammenhang zwischen der Lipidveränderung und der erhöhten Ca^{2+} -ATPase Aktivität in Spermien nach der Fusion gibt. Zusammenfassend führt die Transsekretion (Zell-zu-Zelltransfer) zwischen Epididymosomen und Spermien zur Übertragung von Lipiden und Proteinen mit Einfluss auf die Ca^{2+} -ATPase-Aktivität.

Summary

During the passage through the male reproduction tract spermatozoa interact with factors, which amongst others are released from the epididymis. The outcome of the spermatozoa modification is essential for the maturation to full functional germ cells. During the differentiation in the epididymis the epididymosomes (apocrin secreted epididymal vesicles) play a crucial role. Previous work of our group demonstrated a switch of the plasma membrane Ca^{2+} -ATPase isoform 4 (PMCA4) splice variants from PMCA4b in bovine caput spermatozoa membrane to PMCA4a in bovine cauda spermatozoa membrane. In addition the Ca^{2+} -ATPase activity of spermatozoa increased significantly during the transit through the epididymidis. The possibility of a transfer of PMCA4a from epididymosomes to spermatozoa was postulated (Sanchez-Luengo et al. 2004, Brandenburger et al. 2011).

The aim of the present study was analyze the fusogen properties of epididymosomes closely. Therefore, epididymal vesicles were isolated from different epididymal regions. After this, epididymosomes were characterized morphologically as well as biochemically. Furthermore, the vesicle transfer of membrane components (lipids, proteins) was analyzed, especially the potential transfer of PMCA to bovine epididymal spermatozoa.

Electron microscopical analyses showed, that cauda epididymosomes are greater than caput epididymosomes. Lipid analyses of caput and cauda epididymosomes proved an increase of the cholesterol/phospholipid rate with a decrease of cholesterol and phospholipid concentration. The phospholipids Phosphatidylethanolamine (PE), Phosphatidylcholine (PC) and Sphingomyeline (SM) were predominantly detected, whereby the concentration in caput and cauda epididymosomes was not significantly modified. For protein analyses, the author focused on PMCA. By means of Westernblot analyses, it could be shown, that cauda vesicles exhibit more PMCA4a than caput vesicles. Also the Ca^{2+} -ATPase activity increased significantly from caput to cauda epididymosomes.

To determine in *in vitro* experiments, the fusogen properties of bovine epididymosomes with spermatozoa, bovine epididymosomes were labeled with the fluorescent dye Octadecylrhodamin B (R18). Caput spermatozoa showed a higher fusion rate than cauda spermatozoa. The optimal pH value for the fusion

was in the acid area (pH 5 - 6). Lipid analyses of epididymal spermatozoa proved a decrease of the cholesterol/phospholipid rate from caput to cauda spermatozoa. This could also be achieved after *in vitro* fusion of caput spermatozoa with epididymosomes. Therefore, it is postulated, that this modification is a result of the interaction from spermatozoa with epididymosomes. *In vivo* it was documented that the concentration of PE, PC and SM decreased in spermatozoa during passing through the epididymis, whereby *in vitro* no alterations were determined. After labeling the epididymosomes with Biotin, a transfer of biotin-labeled proteins of epididymosomes on epididymal spermatozoa membrane could be shown by *in vitro* fusion. In fact the Ca^{2+} -ATPase activity increased significantly after *in vitro* fusion of epididymosomes with spermatozoa. Nevertheless, transfer of PMCA4a could not be clarified definitively by immunocytochemistry, because the antibody against PMCA4a reacted deficient on spermatozoa smear. Using the antibody against PMCA4 a slight increase of fluorescence was shown in the middle piece of spermatozoa tail. Furthermore, previous work of our group showed that the Ca^{2+} -ATPase activity of epididymal spermatozoa is stimulated organ-specific by the seminal vesicle major protein PDC-109 respectively (no significant stimulation in heart and kidney) (Sanchez-Luengo et al. 2004). In this study, this stimulation could also be documented for epididymosomes and spermatozoa after *in vitro* fusion. It is well-known that PDC-109 binds on phospholipids and that the PMCA activity can be affected by phospholipids. Further analyses have to display potential correlation between lipid modification and the increase of Ca^{2+} -ATPase activity in spermatozoa after *in vitro* fusion.

In summary, the trans secretion (cell-to-cell transfer) between epididymosomes and spermatozoa resulted in a disposition of lipids and proteins with influencing Ca^{2+} -ATPase-activity.

6 Literaturverzeichnis

- Adamo HP, Pinto Fde T, Bredeston LM & Corradi GR 2003 Acidic-lipid responsive regions of the plasma membrane Ca^{2+} pump. *Ann N Y Acad Sci* 986 552-553.
- Agrawal Y & Vanha-Perttula T 1987 Effect of secretory particles in bovine seminal vesicle secretion on sperm motility and acrosome reaction. *J Reprod Fertil* 79 (2) 409-419
- Agrawal Y & Vanha-Perttula T 1988 Electron microscopic study of the secretion process in bovine reproductive organs. *J Androl* 9 307-316.
- Anderson JM 1996 Cell signalling: MAGUK magic. *Curr Biol* 6 (4) 382-4.
- Appel TR Quantitative Lipidanalyse biologischer Proben durch hochauflösende Dünnschichtchromatographie. *IMB Jena e.V.*
- Arienti G, Carlini E, Nicolucci A, Cosmi EV, Santi F & Palmerini CA 1999 The motility of human spermatozoa as influenced by prostasomes at various pH levels. *Biol Cell* 91 51-54.
- Arienti G, Carlini E & Palmerini CA 1997a Fusion of human sperm to prostasomes at acidic pH. *J Membr Biol* 155 89-94.
- Arienti G, Carlini E, Polci A, Cosmi EV & Palmerini CA 1998 Fatty acid pattern of human prostasome lipid. *Arch Biochem Biophys* 358 391-395.
- Arienti G, Carlini E, Saccardi C & Palmerini CA 2004 Role of human prostasome in the activation of spermatozoa. *J cell mol med* 8 (1) 77-84.
- Arienti G, Carlini E, Verdacchi R, Cosmi EV & Palmerini CA 1997b Prostate to sperm transfer of CD13/aminopeptidase N (EC 3.4.11.2). *Biochim Biophys Acta* 1336 533-538.
- Arienti G, Carlini E, Verdacchi R & Palmerini CA 1997c Transfer of aminopeptidase activity from prostasomes to sperm. *Biochim Biophys Acta* 1336 269-274.
- Arienti G, Polci A, Carlini E & Palmerini CA 1997d Transfer of CD26/dipeptidyl peptidase IV (E.C. 3.5.4.4) from prostasomes to sperm. *FEBS Lett* 410 343-346.
- Arvidson G, Ronquist G, Wikander G & Ojteg AC 1989 Human prostasome membranes exhibit very high cholesterol/phospholipid ratios yielding high molecular ordering. *Biochim Biophys Acta* 984 167-173.
- Aumüller G & Adler G 1979 Experimental studies of apocrine secretion in the dorsal prostate epithelium of the rat. *Cell Tissue Res* 198 145-158.
- Baker PF, Blaustein MP, Manil J & Steinhardt RA 1967 A ouabain-insensitive, calcium-sensitive sodium efflux from giant axons of Loligo. *J Physiol* 191 100P-102P.
- Bailey JL & Buhr MM 1994 Ca^{2+} regulation by cryopreserved bull spermatozoa in response to A23187. *Cryobiol* 30 (5) 470-481.
- Bartlett RJ, French FS & Wilson EM 1984 *In vitro* synthesis and glycosylation of androgen-dependent secretory proteins of rat dorsal prostate and coagulating gland. *Prostate* 5 75-91.

- Bastide F, Meissner G, Fleischer S & Post RL 1973 Similarity of the active site of phosphorylation of the adenosine triphosphatase from transport of sodium and potassium ions in kidney to that for transport of calcium ions in the sarcoplasmic reticulum of muscle. *J Biol Chem* 248(24) 8385-91.
- Benoff S 1993 Preliminaries to fertilization. The role of cholesterol during capacitation of human spermatozoa. *Hum Reprod* 8 2001-2006.
- Bradford, M. M. 1976 A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72 248-54.
- Brandenburger T, Strehler EE, Filoteo AG, Caride AJ, Aumüller G, Post H, **Schwarz A** & Wilhelm B 2011 Switch of PMCA4 Splice Variants in bovine epididymis results in altered isoform expression during functional sperm maturation. *J Biol Chem* 286 (10) 7938-46.
- Brandt H & Hoskins DD 1980 A cAMP-dependent phosphorylated motility protein in bovine epididymal sperm. *J Biol Chem* 255 (3) 982-987.
- Brandt P, Ibrahim E, Bruns GA & Neve RL 1992 Determination of the nucleotide sequence and chromosomal localization of the ATP2B2 gene encoding human Ca(2+)-pumping ATPase isoform PMCA2. *Genomics* 14 484-487
- Brandt P, Zurini M, Neve RL, Rhoads RE & Vanaman TC 1988 A C-terminal, calmodulin-like regulatory domain from the plasma membrane Ca²⁺-pumping ATPase. *Proc Natl Acad Sci USA* 85 2914-2918
- Breitbart H, Darshan R, Rubinstein S 1984 Evidence for the presence of ATP-dependent calcium pump and ATPase activities in bull sperm head membranes. *Biochem Biophys Res Commun* 122 (2) 479-84.
- Breitbart H & Naor Z 1999 Protein kinases in mammalian sperm capacitation and the acrosome reaction. *J Reprod Fertil* 4 151-159.
- Breitbart H, Rubinstein S & Nass-Arden L 1985 The role of calcium and Ca²⁺-ATPase in maintaining motility in ram spermatozoa. *J Biol Chem* 260 11548-11553.
- Breitbart H 2002 Intracellular calcium regulation in sperm capacitation and acrosomal reaction. *Mol Cell Endocrinol* 187 139-144.
- Brodin P, Falchetto R, Vorherr T & Carafoli E 1992 Identification of two domains which mediate the binding of activating phospholipids to the plasma-membrane Ca²⁺ pump. *Eur J Biochem* 204 939-946.
- Brody I, Ronquist G & Gottfries A 1983 Ultrastructural localization of the prostasome - an organelle in human seminal plasma. *Ups J Med Sci* 88 63-80.
- Burke RW, Diamondstone BI, Velapoldi RA & Menis O 1974 Mechanisms of the Liebermann-Burchard and Zak color reactions for cholesterol. *Clin Chem* 20 794-781.
- Carafoli E 1987 Intrazellular calcium homeostasis. *Annu Rev Biochem* 56 395-433
- Carafoli E 1992 The Ca²⁺ pump of the plasma membrane. *J Biol Chem* 267 2115-2118.
- Carafoli E & Guerini D 1993 Molecular and cellular biology of plasma membrane calcium ATPase. *Trends Cardiovasc Med* 3 177-184

- Caride AJ, Chini EN, Homma S, Penniston JT & Dousa TP 1998 mRNA encoding four isoforms of the plasma membrane calcium pump and their variants in rat kidney and nephron segments. *J Lab Clin Med* 132 149-156.
- Caride AJ, Elwess NL, Verma AK, Filoteo AG, Enyedi A, Bajzer Z & Penniston JT 1999 The rate of activation by calmodulin of isoform 4 of the plasma membrane Ca(2+) pump is slow and is changed by alternative splicing. *J Biol Chem* 274 35227-35232.
- Caride AJ, Filoteo AG, Enyedi A, Verma AK & Penniston T 1996 Detection of isoform 4 of the plasma membrane calcium pump in human tissues by using isoform-specific monoclonal antibodies. *Biochem J* 316 353-359
- Caride AJ, Filoteo AG, Penniston JT & Strehler EE 2007 The Plasma Membrane Ca²⁺ Pump Isoform 4a Differs from Isoform 4b in the Mechanism of Calmodulin Binding and Activation Kinetics. *J Biol Chem* 282 (35) 25640-25648.
- Carlini E, Palmerini CA, Cosmi EV & Arienti G 1997 Fusion of sperm with prostasomes: effects on membrane fluidity. *Arch Biochem Biophys* 343 6-12.
- Christova Y, James PS, Cooper TG & Jones R 2002 Lipid diffusion in the plasma membrane of mouse spermatozoa: changes during epididymal maturation, effects of pH, osmotic pressure, and knockout of the c-ros gene. *J Androl* 23 384-392.
- Cook SP, Brokaw CJ, Muller CH & Babcock DF 1994 Sperm chemotaxis: egg peptides control cytosolic calcium to regulate flagellar responses. *Dev Biol* 165 (1) 10-19
- Corazzi L, Fratto G, Pistolesi R & Arienti G 1989 Fusion of Liposomes and Rat Brain Microsomes Examined by Two Assays. *J Membrane Biol* 112 123-129.
- Corazzi L, Pistolesi R & Arienti G 1991 The Fusion of Liposomes to Rat Brain Microsomal Membranes Regulates Phosphatidylserine Synthesis. *J Neurochem* 56 207 - 212.
- Crabo B & Gustafsson B 1964 Distribution of Sodium and Potassium and Its Relation to Sperm Concentration in the Epididymal Plasma of the Bull. *J Reprod Fertil* 7 337-345.
- Cross NL 2000 Sphingomyelin modulates capacitation of human sperm *in vitro*. *Biol Reprod* 63 1129-1134.
- Dacheux JL, Castella S, Gatti JL & Dacheux F 2005 Epididymal cell secretory activities and the role of proteins in boar sperm maturation. *Theriogenology* 63 319-341.
- Dean WL, Chen D, Brandt PC & Vanaman TC 1997 Regulation of platelet plasma membrane Ca²⁺-ATPase by cAMP-dependent and tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem* 272 15113-15119.
- Deganie C & Boyer PD 1973 A borohydride reduction method for characterization of the acyl phosphate linkage in proteins and its application to sarcoplasmic reticulum adenosine triphosphatase. *J Biol Chem* 248(23) 8222-8226
- DeMarco SJ & Strehler EE 2001 Plasma membrane Ca²⁺-atpase isoforms 2b and 4b interact promiscuously and selectively with members of the membrane-

associated guanylate kinase family of PDZ (PSD95/Dlg/ZO-1) domain-containing proteins. *J Biol Chem* 276 21594-21600.

Deng X, He Y & Martin-Deleon PA 2000 Mouse Spam1 (PH-20): evidence for its expression in the epididymis and for a new category of spermatogenic-expressed genes. *J Androl* 21 822-832.

Desnoyers L & Manjunath P 1992 Major proteins of bovine seminal plasma exhibit novel interactions with phospholipid. *J Biol Chem* 267 10149-10155.

Di Leva F, Domi T, Fedrizzi L, Lim D & Carafoli E 2008 The plasma membrane Ca^{2+} ATPase of animal cells: Structure, function and regulation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 476 65-74

Eickhoff R, Jennemann G, Hoffbauer G, Schuring MP, Kaltner H, Sinowatz F, Gabius HJ & Seitz J 2006 Immunohistochemical detection of macrophage migration inhibitory factor in fetal and adult bovine epididymis: release by the apocrine secretion mode? *Cells Tissues Organs* 182 22-31.

Eickhoff R, Wilhelm B, Renneberg H, Wennemuth G, Bacher M, Linder D, Bucala R, Seitz J & Meinhardt A 2001 Purification and characterization of macrophage migration inhibitory factor as a secretory protein from rat epididymis: evidences for alternative release and transfer to spermatozoa. *Mol Med* 7 27-35.

Enyedi A, Elwess NL, Filoteo AG, Verma AK, Paszty K & Penniston JT 1997 Protein kinase C phosphorylates the "a" forms of plasma membrane Ca^{2+} pump isoforms 2 and 3 and prevents binding of calmodulin. *J Biol Chem* 272 27525-27528.

Enyedi A, Flura M, Sarkadi B, Gardos G & Carafoli E 1987 The maximal velocity and the calcium affinity of the red cell calcium pump may be regulated independently. *J Biol Chem* 262 6425-6430.

Enyedi A, Verma AK, Filoteo AG & Penniston JT 1996 Protein kinase C activates the plasma membrane Ca^{2+} pump isoform 4b by phosphorylation of an inhibitory region downstream of the calmodulin-binding domain. *J Biol Chem* 271 32461-32467.

Enyedi A, Verma AK, Heim R, Adamo HP, Filoteo AG, Strehler EE & Penniston JT 1994 The Ca^{2+} affinity of the plasma membrane Ca^{2+} pump is controlled by alternative splicing. *J Biol Chem* 269 41-43.

Enyedi A, Vorherr T, James P, McCormick DJ, Filoteo AG, Carafoli E & Penniston JT 1989 The calmodulin binding domain of the plasma membrane Ca^{2+} pump interacts both with calmodulin and with another part of the pump. *J Biol Chem* 264 12313-12321.

Evans RW & Setchell BP 1979 Lipid changes during epididymal maturation in ram spermatozoa collected at different times of the year. *J Reprod Fertil* 57 197-203.

Fabiani R, Johansson L, Lundkvist O & Ronquist G 1994 Enhanced recruitment of motile spermatozoa by prostasome inclusion in swim-up medium. *Hum Reprod* 9 1485-1489.

Falchetto R, Vorherr T & Carafoli E 1992 The calmodulin-binding site of the plasma membrane Ca^{2+} pump interacts with the transduction domain of the enzyme. *Protein Sci* 1 1613-1621.

- Filoteo AG, Enyedi A, Verma AK, Elwess NL & Penniston JT 2000 Plasma membrane Ca(2+) pump isoform 3f is weakly stimulated by calmodulin. *J Biol Chem* 275 4323-4328.
- Flickinger CJ 1981 Regional differences in synthesis, intracellular transport, and secretion of protein in the mouse epididymis. *Biol Reprod* 25 871-883.
- Florman HM, Jungnickel MK & Sutton KA 2008 Regulating the acrosome reaction. *Int J Dev Biol* 52 503-510.
- Fornes MW, Barbieri A, Sosa MA & Bertini F 1991 First observations on enzymatic activity and protein content of vesicles separated from rat epididymal fluid. *Andrologia* 23 347-351.
- Fornes MW & De Rosas JC 1991 Interactions between rat epididymal epithelium and spermatozoa. *Anat Rec* 231 193-200.
- Fornes MW, Sosa MA, Bertini F & Burgos MH 1995 Vesicles in rat epididymal fluid. Existence of two populations differing in ultrastructure and enzymatic composition. *Androl* 27 (4) 233-237.
- Fouchecourt S, Metayer S, Locatelli A, Dacheux F & Dacheux JL 2000 Stallion epididymal fluid proteome: qualitative and quantitative characterization; secretion and dynamic changes of major proteins. *Biol Reprod* 62 1790-1803.
- Fraser LR, Abeydeera LR & Niwa K 1995 Ca²⁺-Regulating Mechanisms That Modulate Bull Sperm Capacitation and Acrosomal Exocytosis as Determined by Chlortetracycline Analysis. *Mol Reprod Dev* 40 233-241.
- Frenette G, Girouard J, D'Amours O, Allard N, Tessier L, & Sullivan R 2010 Characterization of two distinct populations of epididymosomes collected in the intraluminal compartment of the bovine cauda epididymis. *Biol Reprod* 83(3):473-480
- Frenette G, Girouard J & Sullivan R 2006a Comparison between epididymosomes collected in the intraluminal compartment of the bovine caput and cauda epididymidis. *Biol Reprod* 75 885-890.
- Frenette G, Legare C, Saez F & Sullivan R 2005 Macrophage migration inhibitory factor in the human epididymis and semen. *Mol Hum Reprod* 11 575-582.
- Frenette G, Lessard C & Sullivan R 2002 Selected proteins of "prostasome-like particles" from epididymal cauda fluid are transferred to epididymal caput spermatozoa in bull. *Biol Reprod* 67 308-313.
- Frenette G & Sullivan R 2001 Prostasome-like particles are involved in the transfer of P25b from the bovine epididymal fluid to the sperm surface. *Mol Reprod Dev* 59 115-121.
- Frenette G, Thabet M & Sullivan R 2006b Polyol pathway in human epididymis and semen. *J Androl* 27 233-239.
- Fukushima T, Kato M, Adachi T, Hamada Y, Horimoto M, Komiyama M, Mori C & Horii I 2005 Effects of sulfasalazine on sperm acrosome reaction and gene expression in the male reproductive organs of rats. *Toxicol Sci* 85 675-682.
- Gatti JL, Metayer S, Belghazi M, Dacheux F & Dacheux JL 2005 Identification, proteomic profiling, and origin of ram epididymal fluid exosome-like vesicles. *Biol Reprod* 72 1452-1465.

Girouard J, Frenette G & Sullivan R. 2009 Compartmentalization of proteins in epididymosomes coordinates the association of epididymal proteins with the different functional structures of bovine spermatozoa. *Biol Reprod.* 80 (5) 965-72.

Goyal HO 1985 Morphology of the bovine epididymis. *Am J Anat* 172 155-172.

Greeb J & Shull GE 1989 Molecular cloning of a third isoform of the calmodulin-sensitive plasma membrane Ca^{2+} -transporting ATPase that is expressed predominantly in brain and skeletal muscle. *J Biol Chem* 264 18569-18576

Groos S, Wilhelm B, Renneberg H, Riva A, Reichelt R, Seitz J & Aumuller G 1999 Simultaneous apocrine and merocrine secretion in the rat coagulating gland. *Cell Tissue Res* 295 495-504.

Guerini D 1998 The Ca^{2+} pumps and the $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ exchanger. *Bio metals* 11 319-330.

Hall JC, Hadley J & Doman T 1991 Correlation between changes in rat sperm membrane lipids, protein, and the membrane physical state during epididymal maturation. *J Androl* 12 76-87.

Hasselbach W & Makinose M 1961 [The calcium pump of the "relaxing granules" of muscle and its dependence on ATP-splitting.]. *Biochem Z* 333 518-528.

Hermo L & Jacks D 2002 Nature's ingenuity: bypassing the classical secretory route via apocrine secretion. *Mol Reprod Dev* 63 394-410.

Ho HC & Suarez SS 2003 Characterization of the intracellular calcium store at the base of the sperm flagellum that regulates hyperactivated motility. *Biol Reprod.* 68 (5) 1590-1596.

Ho KC, Quarmby VE, French FS & Wilson EM 1992 Molecular cloning of rat prostate transglutaminase complementary DNA. The major androgen-regulated protein DP1 of rat dorsal prostate and coagulating gland. *J Biol Chem* 267 12660-12667.

Hoekstra D, de Boer T, Klappe K & Wilschut J 1984 Fluorescence method for measuring the kinetics of fusion between biological membranes. *Biochemistry* 23 5675-5681.

Holland MK, Vreeburg JTM & Orgebin-Crist MC 1992 Testicular regulation of epididymal protein secretion. *J Andrology* 13 (3) 266-273

Holterhus PM, Zhao GQ & Aumuller G 1993 Effects of androgen deprivation and estrogen treatment on the structure and protein expression of the rat coagulating gland. *Anat Rec* 235 223-232.

Hoshi K, Aita T, Yanagida K, Yoshimatsu N & Sato A 1990 Variation in the cholesterol/phospholipid ratio in human spermatozoa and its relationship with capacitation. *Hum Reprod* 5 71-74.

Hoskins DD, Hall ML & Munsterman D 1975 Induction of motility in immature bovine spermatozoa by cyclic AMP phosphodiesterase inhibitors and seminal plasma. *Biol Reprod* 13 168-176.

Inesi G & Kirtley MR 1992 Structural Features of Cation Transport ATPase. *J Bioenergetics and Biomembranes* 24 (3) 271-283

- James P, Maeda M, Fischer R, Verma AK, Krebs J, Penniston JT & Carafoli E 1988 Identification and primary structure of a calmodulin binding domain of the Ca²⁺ pump of human erythrocytes. *J Biol Chem* 263 2905-2910.
- James P, Pruschy M, Vorherr TE, Penniston JT & Carafoli E 1989 Primary structure of the cAMP-dependent phosphorylation site of the plasma membrane calcium pump. *Biochemistry* 28 4253-4258
- James P, Zvaritch EI, Shakhparonov MI, Penniston JT & Carafoli E 1987 The amino acid sequence of the phosphorylation domain of the erythrocyte Ca²⁺ ATPase. *Biochem Biophys Res Commun* 149 7-12.
- Kaupp UB, Hildebrand E & Weyand I 2006 Sperm chemotaxis in marine invertebrates--molecules and mechanisms. *J Cell Physiol* 208 487-494.
- Kim E, Niethammer M, Rothschild A, Jan YN & Sheng M 1995 Clustering of Shaker-type K⁺ channels by interaction with a family of membrane-associated guanylate kinases. *Nature* 378 85-88.
- Kim E, DeMarco SJ, Marfatia SM, Chishti AH, Sheng M & Strehler EE 1998 Plasma membrane Ca²⁺ ATPase isoform 4b binds to membrane-associated guanylate kinase (MAGUK) proteins via their PDZ (PSD-95/Dlg/ZO-1) domains. *J Biol Chem* 273 1591-1595.
- Kirchhoff C 1996 CD52 is the 'major maturation-associated' sperm membrane antigen. *Molecular Human Reproduction* 2 (1) 9-17
- Kirchhoff C & Hale G 1996 Cell-to-cell transfer of glycosylphosphatidylinositol-anchored membrane proteins during sperm maturation. *Mol Hum Reprod* 2 177-184.
- Knobil E & Neill J 1988 The physiology of Reproduction. *Raven Press, Ltd.* New York.
- Kurosumi K, Shibasaki S & Ito T 1984 Cytology of the secretion in mammalian sweat gland. *Int Rev Cytol* 87 253-329.
- Lakoski KA, Carron CP, Cabot CL & Saling PM 1988 Epididymal maturation and the acrosome reaction in mouse sperm: response to zona pellucida develops coincident with modification of M42 antigen. *Biol Reprod* 38 221-233.
- Latif F, Duh FM, Gnarr J, Tory K, Kuzmin I, Yao M, Stackhouse T, Modi W, Geil L, Schmidt L, Li H, Orcutt ML, Maher E, Richards F, Phipps M, Ferguson-Smith M, Le Paslier D, Linehan WM, Zbar B & Lerman MI 1993 von Hippel-Lindau syndrome: cloning and identification of the plasma membrane Ca(++)-transporting ATPase isoform 2 gene that resides in the von Hippel-Lindau gene region. *Cancer Res* 53 861-867
- Legare C, Berube B, Boue F, Lefievre L, Morales CR, El-Alfy M & Sullivan R 1999a Hamster sperm antigen P26h is a phosphatidylinositol-anchored protein. *Mol Reprod Dev* 52 225-233.
- Legare C, Gaudreanet c, St-Jaques S & Sullivan R 1999b P34h sperm protein is preferentially expressed by the human corpus epididymidis. *Endocrinology* 140 (7) 3318-3327
- Levine N & Marsh DJ 1971 Micropuncture studies of the electrochemical aspects of fluid and electrolyte transport in individual seminiferous tubules, the epididymis and the vas deferens in rats. *J Physiol* 213 557-570.

- Liebich HG 2003 Funktionelle Histologie der Haussäugetiere: Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Praxis. *Schattauer*, Stuttgart
- Lotersztajn S, Pavoine C, Deterre P, Capeau J, Mallat A, LeNguyen D, Dufour M, Rouot B, Bataille D & Pecker F 1992 Role of G protein beta gamma subunits in the regulation of the plasma membrane Ca^{2+} pump. *J Biol Chem* 267 2375-2379.
- Luo W, Grupp IL, Harrer J, Ponniah S, Grupp G, Duffy JJ, Doetschman T & Kranias EG 1994 Targeted ablation of the phospholamban gene is associated with markedly enhanced myocardial contractility and loss of beta-agonist stimulation. *Circ Res* 75 401-409.
- MacLennan DH 1970 Purification and properties of an adenosine triphosphatase from sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 245 4508-4518.
- Manin M, Lecher P, Martinez A, Tournadre S & Jean C 1995 Exportation of mouse vas deferens protein, a protein without a signal peptide, from mouse vas deferens epithelium: a model of apocrine secretion. *Biol Reprod* 52 50-62.
- Marmor MD and Julius M 2001 Role for lipid rafts in regulating interleukin-2 receptor signaling. *Blood* 98 (5) 1489-1497.
- Marquez B & Suarez SS 2004 Different Signaling Pathways in Bovine Sperm Regulate Capacitation and Hyperactivation. *Biol Reprod* 70 1626-1633.
- Marquez B & Suarez SS 2007 Bovine sperm hyperactivation is promoted by alkaline-stimulated Ca^{2+} influx. *Biol Reprod* 76 660-665.
- Missiaen L, Raeymaekers L, Wuytack F, Vrolix M, de Smedt H & Casteels R 1989 Phospholipid-protein interactions of the plasma-membrane Ca^{2+} -transporting ATPase. Evidence for a tissue-dependent functional difference. *Biochem J* 263 687-694.
- Muller P, Erlemann KR, Muller K, Calvete JJ, Topfer-Petersen E, Marienfeld K & Herrmann A 1998 Biophysical characterization of the interaction of bovine seminal plasma protein PDC-109 with phospholipid vesicles. *Eur Biophys J* 27 33-41.
- Nagafuku M, Kabayama K, Oka D, Kato A, Tani-ichi S, Shimada Y, Ohni-Iwashita Y, Yamasaki S, Saito T, Iwabuchi K, Hamaoka T, Inokuchi J & Kosugi A 2003 Reduction of glycosphingolipid levels in lipid rafts affects the expression state and function of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins but does not impair signal transduction via the T cell receptor. *J Biol Chem* 278 (51) 51920-51927.
- NagDas SK, Mukherjee S, Mazumder B & Sen PC 1988 Identification and characterization of a Mg^{2+} -dependent and an independent Ca^{2+} -ATPase in microsomal membranes of rat testis. *Mol Cell Biochem* 79 161-169.
- Nicander L 1958 Studies on the regional histology and cytochemistry of the ductus epididymidis in stallions, rams and bulls. *Acta Morphol Neerl Scand* 1 337-362.
- Nickel & Schummer 2003 Lehrbuch der Anatomie der Haustiere. *Parey Medizin Verlag* Stuttgart
- Niggli V, Adunyah ES & Carafoli E 1981 Acidic phospholipids, unsaturated fatty acids, and limited proteolysis mimic the effect of calmodulin on the purified erythrocyte Ca^{2+} - ATPase. *J Biol Chem* 256 8588-8592.

- Niggli V, Penniston JT & Carafoli E 1979 Purification of the (Ca²⁺-Mg²⁺)-ATPase from human erythrocyte membranes using a calmodulin affinity column. *J Biol Chem* 254 9955-9958.
- Niggli V, Sigel E & Carafoli E 1982 The purified Ca²⁺ pump of human erythrocyte membranes catalyzes an electroneutral Ca²⁺-H⁺ exchange in reconstituted liposomal systems. *J Biol Chem* 257 2350-2356.
- Nikolopoulou M, Soucek DA & Vary JC 1985 Changes in the lipid content of boar sperm plasma membranes during epididymal maturation. *Biochim Biophys Acta* 815 486-498.
- Oh JS, Han C & Cho C 2009 ADAM7 is associated with epididymosomes and integrated into sperm plasma membrane. *Mol Cells* 28 441-446.
- Okunade GW, Miller ML, Pyne GJ, Sutliff RL, O'Connor KT, Neumann JC, Andringa A, Miller DA, Prasad V, Doetschman T, et al. 2004 Targeted ablation of plasma membrane Ca²⁺-ATPase (PMCA) 1 and 4 indicates a major housekeeping function for PMCA1 and a critical role in hyperactivated sperm motility and male fertility for PMCA4. *J Biol Chem* 279 33742-33750.
- Olson S, Wang MG, Carafoli E, Strehler EE & McBride OW 1991 Localization of two genes encoding plasma membrane Ca²⁺-transporting ATPases to human chromosomes 1q25-32 and 12q21-23. *Genomics* 9 629-641.
- Orgebin-Crist MC 1967 Sperm maturation in rabbit epididymis. *Nature* 216 816-818.
- Palade G 1975 Intracellular aspects of the process of protein synthesis. *Science* 189 347-358.
- Palmerini CA, Carlini E, Nicolucci A & Arienti G 1999 Increase of human spermatozoa intracellular Ca²⁺ concentration after fusion with prostasomes. *Cell Calcium* 25 291-296.
- Parks JE & Hammerstedt RH 1985 Development changes occurring in the lipids of ram epididymal spermatozoa plasma membrane. *Biol Reprod* 32 653-668.
- Philipson KD & Nicoll DA 1992 Sodium-calcium exchange. *Curr Opin Cell Biol* 4 678-683.
- Post H, Gutberlet J, Wiche R, Aumuller G & Wilhelm B 2008 The localization of PMCA1b in epithelial cells and aposomes of the rat coagulating gland is influenced by androgens. *Prostate* 68 1076-1085.
- Post H, **Schwarz A**, Brandenburger T, Aumuller G & Wilhelm B 2010 Arrangement of PMCA4 in bovine sperm membrane fractions. *Int J Androl* 33 (6) 775-783.
- Post H, Wiche R, Sen PC, Hoffbauer G, Albrecht M, Seitz J, Aumuller G & Wilhelm B 2002 Identification of a plasma membrane Ca²⁺-ATPase in epithelial cells and aposomes of the rat coagulating gland. *Prostate* 52 159-166.
- Poulos A, Voglmayr JK & White IG 1973 Phospholipid changes in spermatozoa during passage through the genital tract of the bull. *Biochim Biophys Acta* 306 194-202.
- Prasad V, Okunade GW, Miller ML & Shull GE 2004 Phenotypes of SERCA and PMCA knockout mice. *Biochem Biophys Res Commun* 322 1192-1203.

- Preiano BS, Guerini D & Carafoli E 1996 Expression and functional characterization of isoforms 4 of the plasma membrane calcium pump. *Biochemistry* 35 7946-7953.
- Ramakrishnan M, Anbazhagan V, Pratap TV, Marsh D & Swamy MJ 2001 Membrane insertion and lipid-protein interactions of bovine seminal plasma protein PDC-109 investigated by spin-label electron spin resonance spectroscopy. *Biophys J* 81 2215-2225.
- Ramos AS, Jr. & Dym M 1977 Fine structure of the monkey epididymis. *Am J Anat* 149 501-531.
- Rana AP, Majumder GC, Misra S & Ghosh A 1991 Lipid changes of goat sperm plasma membrane during epididymal maturation. *Biochim Biophys Acta* 1061 185-196.
- Reinhardt TA & Horst RL 1999 Ca^{2+} -ATPases and their expression in the mammary gland of pregnant and lactating rats. *Am J Physiol* 276 C796-802.
- Rejraji H, Sion B, Prensier G, Carreras M, Motta C, Frenoux JM, Vericel E, Grizard G, Vernet P & Drevet JR 2006 Lipid remodeling of murine epididymosomes and spermatozoa during epididymal maturation. *Biol Reprod* 74 1104-1113.
- Rejraji H, Vernet P & Drevet JR 2002 GPX5 is present in the mouse caput and cauda epididymidis lumen at three different locations. *Mol Reprod Dev* 63 96-103.
- Reuter H & Seitz N 1968 The dependence of calcium efflux from cardiac muscle on temperature and external ion composition. *J Physiol* 195 451-470.
- Robinson JD 1976 (Ca + Mg)-stimulated ATPase activity of a rat brain microsomal preparation. *Arch Biochem Biophys* 176 366-374.
- Ronner P, Gazzotti P & Carafoli E 1977 A lipid requirement for the (Ca^{2+} + Mg^{2+})-activated ATPase of erythrocyte membranes. *Arch Biochem Biophys* 179 578-583.
- Ronquist G 1987 Effect of modulators on prostasome membrane-bound ATPase in human seminal plasma. *Eur J Clin Invest* 17 231-236.
- Ronquist G & Brody I 1985 The prostasome: its secretion and function in man. *Biochim Biophys Acta* 822 203-218.
- Saling PM 1982 Development of the ability to bind to zonae pellucidae during epididymal maturation: reversible immobilization of mouse-spermatozoa by lanthanum. *Biol Reprod* 26 (3) 429-436.
- Sanchez-Luengo S, Aumuller G, Albrecht M, Sen PC, Rohm K & Wilhelm B 2004 Interaction of PDC-109, the major secretory protein from bull seminal vesicles, with bovine sperm membrane Ca^{2+} -ATPase. *J Androl* 25 234-244.
- Santamarina E & Recce RP 1957 Normal development of the germinal epithelium and seminiferous tubules in the bull. *Am J Vet Res* 18 (67) 261-278.
- Schaumburg-Lever G & Lever WF 1975 Secretion from human apocrine glands: an electron microscopic study. *J Invest Dermatol* 64 38-41.
- Schiefferdecker 1922 Die Hautdrüsen des Menschen und der Säugetiere, ihre biologische und rassenanatomische Bedeutung, sowie die muscularis sexualis. Stuttgart: Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung.

- Schuh K, Cartwright EJ, Jankevics E, Bundschu K, Liebermann J, Williams JC, Armesilla AL, Emerson M, Oceandy D, Knobloch KP & Neyses L. 2004 Plasma membrane Ca^{2+} ATPase 4 is required for sperm motility and male fertility. *J Biol Chem* 279 28220-28226.
- Schuh K, Uldrijan S., Gambaryan S., Roethlein N. & Neyses L. 2003 Interaction of the Plasma Membrane Ca^{2+} Pump 4b/CI with the Ca^{2+} /Calmodulin-dependent Membrane-associated Kinase CASK. *J Biol Chem* 278 (11) 9778–9783
- Seitz J, Keppler C, Rausch U & Aumuller G 1990 Immunohistochemistry of secretory transglutaminase from rodent prostate. *Histochemistry* 93 525-530.
- Serres C, Feneux D & Berthon B 1991 Decrease of internal free calcium and human sperm movement. *Cell Motil Cytoskeleton* 18 228-240.
- Shull GE & Greeb J 1988 Molecular cloning of two isoforms of the plasma membrane Ca^{2+} -transporting ATPase from rat brain. Structural and functional domains exhibit similarity to Na^{+} , K^{+} - and other cation transport ATPases. *J Biol Chem* 263 8646-8657
- Sikdar R, Ganguly U, Chandra GA & Sen PC 1993 Calcium uptake and Ca^{2+} -ATPase activity in goat spermatozoa membrane vesicles do not require Mg^{2+} . *J Biosci* 18 73-82.
- Sikdar R, Ganguly U, Pal P, Mazumder B & Sen PC 1991 Biochemical characterization of a calcium ion stimulated-ATPase from goat spermatozoa. *Mol Cell Biochem* 103 121-130.
- Simons K & Ikonen E 1997 Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387 569-572.
- Simons K & Toomre D 2000 Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1 (1) 31-39
- Stauffer TP, Guerini D & Carafoli E 1995 Tissue distribution of the four gene products of the plasma membrane Ca^{2+} pump. A study using specific antibodies. *J Biol Chem* 270 12184-12190.
- Stauffer TP, Hilfiker H, Carafoli E & Strehler EE 1993 Quantitative analysis of alternative splicing options of human plasma membrane calcium pump genes. *J Biol Chem* 268 25993-26003.
- Steinhoff M, Eicheler W, Holterhus PM, Rausch U, Seitz J & Aumuller G 1994 Hormonally induced changes in apocrine secretion of transglutaminase in the rat dorsal prostate and coagulating gland. *Eur J Cell Biol* 65 49-59.
- Stokes DL, Auer M, Zhang P & Kuhlbrandt W 1999 Comparison of H^{+} -ATPase and Ca^{2+} -ATPase suggests that a large conformational change initiates P-type ion pump reaction cycles. *Curr Biol* 9 672-679.
- Street VA, McKee-Johnson JW, Fonseca RC, Tempel BL & Noben-Trauth K 1998 Mutations in a plasma membrane Ca^{2+} -ATPase gene cause deafness in deafwaddler mice. *Nat Genet* 19 390-394.
- Strehler EE 1990 Plasma membrane Ca^{2+} pumps and $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ exchangers. *Semin Cell Biol* 1 (4) 283-295

- Strehler EE & Zacharias DA 2001 Role of Alternative Splicing in Generating Isoform Diversity Among Plasma Membrane Calcium Pumps. *Physiol Rev* 81 21-50
- Suarez SS 2008 Control of hyperactivation in sperm. *Human Reprod Update* 14(6) 647–657
- Suarez HH & Ho HC 2003 Hyperactivated Motility in Sperm. *Reprod Dom Anim* 38 119–124
- Suarez SS, Varosi SM & Dai X 1993 Intracellular calcium increases with hyperactivation in intact, moving hamster sperm and oscillates with the flagellar beat cycle. *Proc Natl Acad Sci USA* 90 4660-4664
- Subbarow CHFaY 1925. *J Biol Chem* 66 375.
- Sullivan R, Frenette G & Girouard J 2007 Epididymosomes are involved in the acquisition of new sperm proteins during epididymal transit. *Asian J Androl* 9 483-491.
- Syntin P, Dacheux F, Druart X, Gatti JL, Okamura N & Dacheux JL 1996 Characterization and identification of proteins secreted in the various regions of the adult boar epididymis. *Biol Reprod* 55 956-974.
- Syntin P, Dacheux JL & Dacheux F 1999 Postnatal development and regulation of proteins secreted in the boar epididymis. *Biol Reprod* 61 1622-1635.
- Therien I, Bleau G & Manjunath P 1995 Phosphatidylcholine-binding proteins of bovine seminal plasma modulate capacitation of spermatozoa by heparin. *Biol Reprod* 52 1372-1379.
- Thimon V, Frenette G, Saez F, Thabet M & Sullivan R 2008 Protein composition of human epididymosomes collected during surgical vasectomy reversal: a proteomic and genomic approach. *Hum Reprod* 23 1698-1707.
- Tilcock CP & Cullis PR 1987 Lipid polymorphism. *Ann N Y Acad Sci* 492 88-102.
- Triphan J, Aumuller G, Brandenburger T & Wilhelm B 2007 Localization and regulation of plasma membrane Ca(2+)-ATPase in bovine spermatozoa. *Eur J Cell Biol* 86 265-273.
- Turner TT, Jones CE, Howards SS, Ewing LL, Zegeye B & Gunsalus GL 1984 On the androgen microenvironment of maturing spermatozoa. *Endocrinology* 115 1925-1932.
- Turner TT, Riley TA, Vagnetti M, Flickinger CJ, Caldwell JA & Hunt DF 2000 Postvasectomy alterations in protein synthesis and secretion in the rat caput epididymidis are not repaired after vasovasostomy. *J Androl* 21 276-290.
- Utleig AG, Yi EC, Xie T, Shannon P, White JT, Goodlett DR, Hood L & Lin B 2003 Proteomic analysis of human prostasomes. *Prostate* 56 150-161.
- Vanithakumari G & Govindarajulu P 1985 Adenosine triphosphatase systems in genital tract of testosterone treated male adult monkeys. *Indian J Physiol Pharmacol* 29 1-6.
- Verma AK, Filoteo AG, Stanford DR, Wieben ED, Penniston JT, Strehler EE, Fischer R, Heim R, Vogel G, Mathews S, Strehler-Page M, James P, Vorher T, Krebs J & Carafoli E 1988 Complete primary structure of a human plasma membrane Ca²⁺ pump. *J Biol Chem* 263 14152-14159.

- Vijayaraghavan S & Hoskins DD 1990 Changes in the mitochondrial calcium influx and efflux properties are responsible for the decline in sperm calcium during epididymal maturation. *Mol Reprod Dev* 25 186-194.
- Vijayasathya S, Shivaji S & Balaram P 1980 Plasma membrane bound Ca^{2+} -ATPase activity in bull sperm. *FEBS Lett* 114 45-47.
- Vilsen B 1995 Structure-function relationships in the Ca^{2+} -ATPase of sarcoplasmic reticulum studied by use of the substrate analogue CrATP and site-directed mutagenesis. Comparison with the $\text{Na}^{+},\text{K}^{+}$ -ATPase. *Acta Physiol Scand Suppl* 624 1-146.
- Visconti PE, Moore GD, Bailey JL, Leclerc P, Connors SA, Pan D, Olds-Clarke P & Kopf GS 1995 Capacitation of mouse spermatozoa. II. Protein tyrosine phosphorylation and capacitation are regulated by a cAMP-dependent pathway. *Develop* 121 (4) 1139-1150.
- Vreeburg JT 1975 Distribution of testosterone and 5 α -dihydrotestosterone in rat epididymis and their concentrations in efferent duct fluid. *J Endocrinol* 67 203-210.
- Wan TC, Zabe M & Dean WL 2003 Plasma membrane Ca^{2+} -ATPase isoform 4b is phosphorylated on tyrosine 1176 in activated human platelets. *Thromb. Haemost* 89 122-131
- Wang MG, Yi H, Hilfiker H, Carafoli E, Strehler EE & McBride OW 1994 Localization of two genes encoding plasma membrane Ca^{2+} ATPases isoforms 2 (ATP2B2) and 3 (ATP2B3) to human chromosomes 3p26-->p25 and Xq28, respectively. *Cytogenet Cell Genet* 67 41-45.
- Wennemuth G, Babcock DF & Hille B 2003 Calcium clearance mechanisms of mouse sperm. *J Gen Physiol* 122 115-128.
- Wilhelm B, Brandenburger T, Post H & Aumuller G 2008 Expression and localization of PMCA4 in rat testis and epididymis. *Histochem Cell Biol* 129 331-343.
- Wilhelm B, Keppler C, Hoffbauer G, Lottspeich F, Linder D, Meinhardt A, Aumuller G & Seitz J 1998 Cytoplasmic carbonic anhydrase II of rat coagulating gland is secreted via the apocrine export mode. *J Histochem Cytochem* 46 505-511.
- Williams KM & Ford WC 2003 Effects of Ca -ATPase inhibitors on the intracellular calcium activity and motility of human spermatozoa. *Int J Androl* 26 366-375.
- Wuytack F & Raemaekers L 1992 The Ca^{2+} -transport ATPase from the plasma membrane. *J Bioenerg Biomembr* 24 (3) 285-300
- Yanagimachi R, Kamiguchi Y, Mikamo K, Suzuki F & Yanagimachi H 1985 Maturation of spermatozoa in the epididymis of the Chinese hamster. *Am J Anat* 172 317-330.
- Yeung CH, Schroter S, Wagenfeld A, Kirchhoff C, Kliesch S, Poser D, Weinbauer GF, Nieschlag E & Cooper TG 1997 Interaction of the human epididymal protein CD52 (HE5) with epididymal spermatozoa from men and cynomolgus monkeys. *Mol Reprod Dev* 48 267-275.

Zacharias DA & Kappen C 1999 Developmental expression of the four plasma membrane calcium ATPase (Pmca) genes in the mouse. *Biochim Biophys Acta* 1428 397-405.

Zarintash RJ & Cross NL 1996 Unesterified cholesterol content of human sperm regulates the response of the acrosome to the agonist, progesterone. *Biol Reprod* 55 19-24.

Zvaritch E, James P, Vorherr T, Falchetto R, Modyanov N & Carafoli E 1990 Mapping of functional domains in the plasma membrane Ca^{2+} pump using trypsin proteolysis. *Biochemistry* 29 8070-8076.

7 Anhang

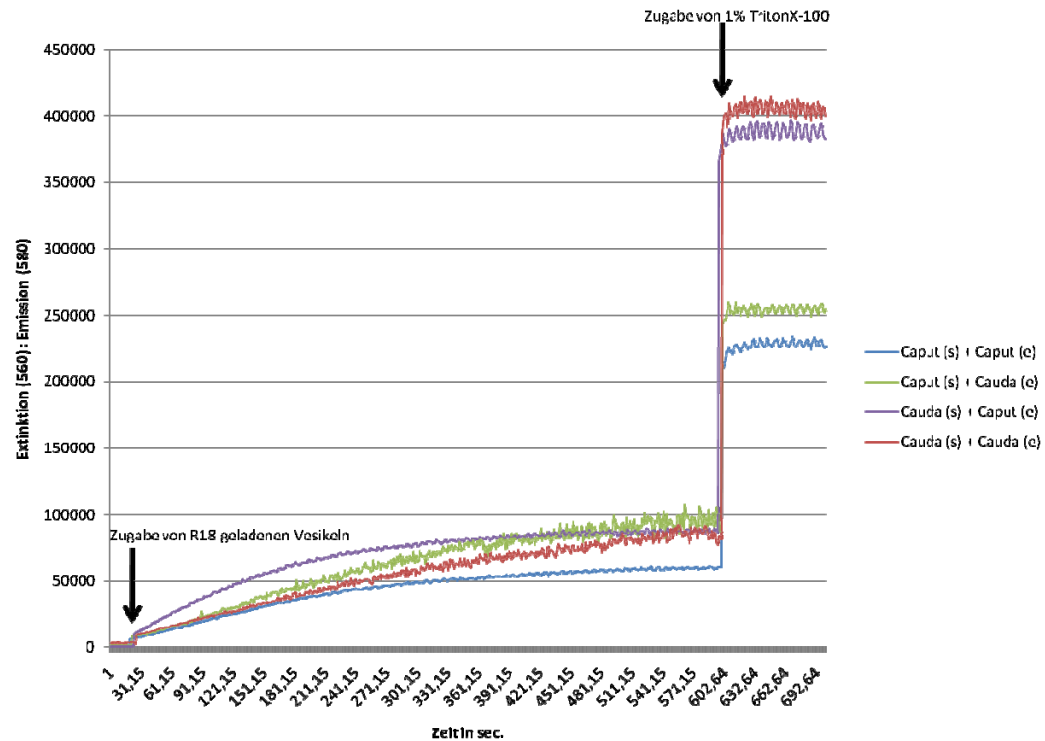


Abb. 44: Fluoreszenzmessung am Delta Scan Illuminationssystem (Emission $\lambda = 580$, Extinktion $\lambda = 560$). Nach Zugabe von R18 markierten Epididymosomen (e) (bei $t = 30$ sec.) zu unmarkierten bovinen Nebenhodenspermien (s) konnte ein Anstieg der Fluoreszenz gemessen werden. Die Messung wurde im Puffer mit 0,32 mol/L Sucrose mit 20 mmol/L MES bei pH= 5 durchgeführt. Nach ca. $t = 600$ sec. erfolgte die Zugabe von 1% TritonX-100 (v/v, Endkonzentration), wodurch der maximale Fluoreszenzanstieg erreicht werden konnte. Die Abbildung zeigt exemplarisch eine Messung, von jeder Spermien/Vesikel-Kombination.

Tab. 10: Der prozentuale Fluoreszenzanstieg nach Zugabe (t= 30 sec.) R18 markierter Epididymosomen (e) zu bovinen Nebenhodenspermien (s) bei einem Proteinverhältnis von 2:1 (Spermien: Epididymosomen) in Abhängigkeit von der Zeit (t= 600 sec.). Die Fusion wurde im Puffer 0,32 mol/L Sucrose mit 20 mmol/L MES bei pH= 5,0 durchgeführt. Nach ca. t= 600 sec. erfolgte die Zugabe von 1% TritonX-100 (v/v, Endkonzentration), wodurch der maximale (100%) Fluoreszenzanstieg erreicht wurde. Die prozentuale Fluoreszenz (Mittelwert) errechnete sich aus 4 unabhängig durchgeführten Messungen (n= 4). Die prozentuale Fusion wurde aus der prozentualen Fluoreszenz mit der Formel $F = FI \times (I+r)/I$ nach Corazzi et al. 1991 abgeleitet (siehe Kap. 2.3.1.4; S. 29).

pH 5																				
Zeit in sec.	30	60	120	150	180	210	240	270	300	330	360	390	420	450	480	510	540	570	600	Triton-X
Caput (s) + Caput (e)																				
Fluoreszenz in %	0%	4%	9%	12%	15%	18%	21%	22%	24%	26%	27%	28%	29%	30%	31%	32%	32%	33%	35%	100%
Fusion in %	0%	7%	13%	18%	23%	27%	31%	34%	36%	39%	41%	42%	44%	45%	46%	47%	48%	49%	52%	
SE	-	0,01	0,02	0,02	0,03	0,04	0,04	0,05	0,05	0,06	0,06	0,07	0,07	0,08	0,08	0,08	0,09	0,09	0,09	
Cauda (s) + Cauda (e)																				
Fluoreszenz in %	0%	3%	5%	7%	8%	10%	12%	13%	14%	15%	16%	17%	17%	18%	19%	19%	20%	21%	22%	100%
Fusion in %	0%	4%	7%	10%	13%	15%	17%	19%	21%	23%	24%	25%	26%	27%	28%	29%	30%	31%	33%	
SE	-	0,01	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05	0,05	0,06	0,07	0,07	0,08	0,08	0,09	0,09	0,10	0,11	0,11	0,11	
Caput (s) + Cauda (e)																				
Fluoreszenz in %	0%	4%	8%	11%	14%	16%	19%	21%	23%	25%	26%	28%	29%	30%	31%	32%	33%	34%	36%	100%
Fusion in %	0%	6%	11%	16%	21%	25%	28%	31%	34%	37%	40%	42%	43%	45%	47%	48%	49%	50%	54%	
SE	-	0,02	0,04	0,05	0,06	0,07	0,08	0,09	0,09	0,10	0,11	0,11	0,12	0,12	0,13	0,13	0,14	0,14	0,14	
Cauda (s) + Caput (e)																				
Fluoreszenz in %	0%	4%	7%	10%	12%	14%	16%	17%	19%	20%	21%	22%	22%	23%	24%	24%	25%	25%	28%	100%
Fusion in %	0%	6%	11%	15%	18%	21%	24%	26%	28%	29%	31%	32%	34%	35%	36%	37%	37%	38%	42%	
SE	-	0,02	0,03	0,04	0,05	0,06	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,08	

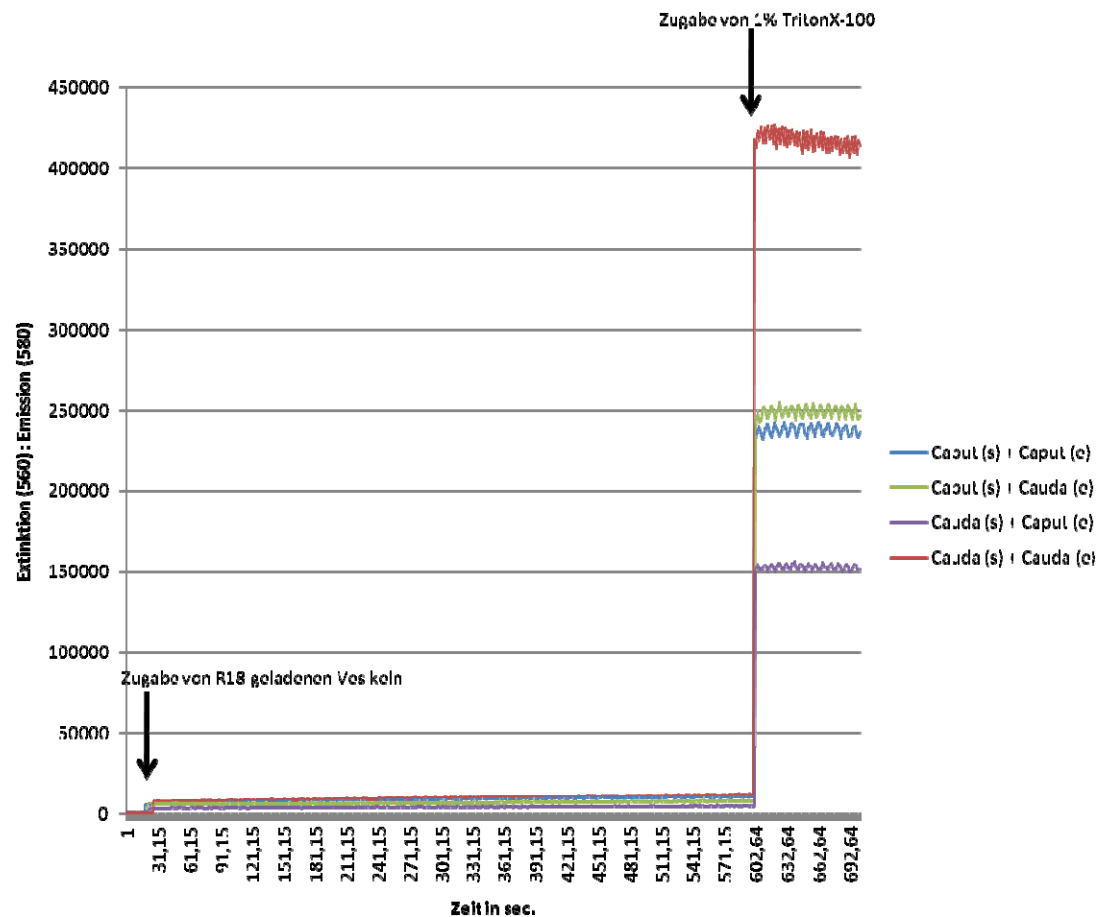


Abb. 45: Fluoreszenzmessung am Delta Scan Illuminationssystem (Emission $\lambda = 580$, Extinktion $\lambda = 560$). Nach Zugabe von R18 markierten Epididymosomen (e) (bei $t = 30$ sec.) zu unmarkierten bovinen Nebenhodenspermien (s) konnte ein Anstieg der Fluoreszenz gemessen werden. Die Messung wurde im Puffer mit 0,32 mol/L Sucrose mit 2 mmol/L HEPES bei pH= 7 durchgeführt. Nach ca. $t = 600$ sec. erfolgte die Zugabe von 1% TritonX-100 (v/v, Endkonzentration), wodurch der maximale Fluoreszenzanstieg erreicht werden konnte. Die Abbildung zeigt exemplarisch eine Messung, von jeder Spermien/Vesikel-Kombination.

Tab. 11: Der prozentuale Fluoreszenzanstieg nach Zugabe (t= 30 sec.) R18 markierter Epididymosomen (e) zu bovinen Nebenhodenspermien (s) bei einem Proteinverhältnis von 2:1 (Spermien: Epididymosomen) in Abhängigkeit von der Zeit (t= 600 sec.). Die Fusion wurde mit dem Puffer 0,32 mol/L Sucrose mit 2 mmol/L HEPES bei pH= 7,0 durchgeführt. Nach ca. t= 600 sec. erfolgte die Zugabe von 1% TritonX-100 (v/v, Endkonzentration), wodurch der maximale (100%) Fluoreszenzanstieg erreicht wurde. Die prozentuale Fluoreszenz errechnete sich aus 4 unabhängig durchgeführten Messungen (n= 4). Die prozentuale Fusion wurde aus der prozentualen Fluoreszenz mit der Formel $F = FI \times (I+r)/I$ nach Corazzi et al. 1991 abgeleitet (siehe Kap. 2.3.1.4; S. 29).

pH 7																				
Zeit in sec.	30	60	120	150	180	210	240	270	300	330	360	390	420	450	480	510	540	570	600	Triton-X
Caput (s) + Caput (e)																				
Fluoreszenz in %	0%	0%	0%	1%	1%	1%	1%	1%	1%	1%	1%	1%	2%	2%	2%	2%	2%	2%	2%	100%
Fusion in %	0%	0%	1%	1%	1%	1%	1%	2%	2%	2%	2%	2%	2%	2%	3%	3%	3%	3%	3%	
SE	-	0,00	0,00	0,00	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	
Cauda (s) + Cauda (e)																				
Fluoreszenz in %	0%	0%	0%	1%	1%	1%	1%	1%	1%	1%	1%	1%	2%	2%	2%	2%	2%	2%	2%	100%
Fusion in %	0%	1%	1%	1%	1%	1%	1%	2%	2%	2%	2%	2%	2%	2%	3%	3%	3%	3%	3%	
SE	-	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	
Caput (s) + Cauda (e)																				
Fluoreszenz in %	0%	1%	1%	1%	2%	2%	2%	2%	2%	3%	3%	3%	3%	3%	3%	3%	4%	4%	5%	100%
Fusion in %	0%	1%	2%	2%	2%	3%	3%	3%	3%	4%	4%	4%	5%	5%	5%	5%	6%	6%	7%	
SE	-	0,01	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,04	0,05	
Cauda (s) + Caput (e)																				
Fluoreszenz in %	0%	0%	0%	1%	1%	1%	1%	1%	1%	1%	1%	1%	1%	1%	2%	2%	2%	2%	2%	100%
Fusion in %	0%	0%	1%	1%	1%	1%	1%	1%	2%	2%	2%	2%	2%	2%	2%	2%	2%	3%	3%	
SE	-	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,01	0,01	

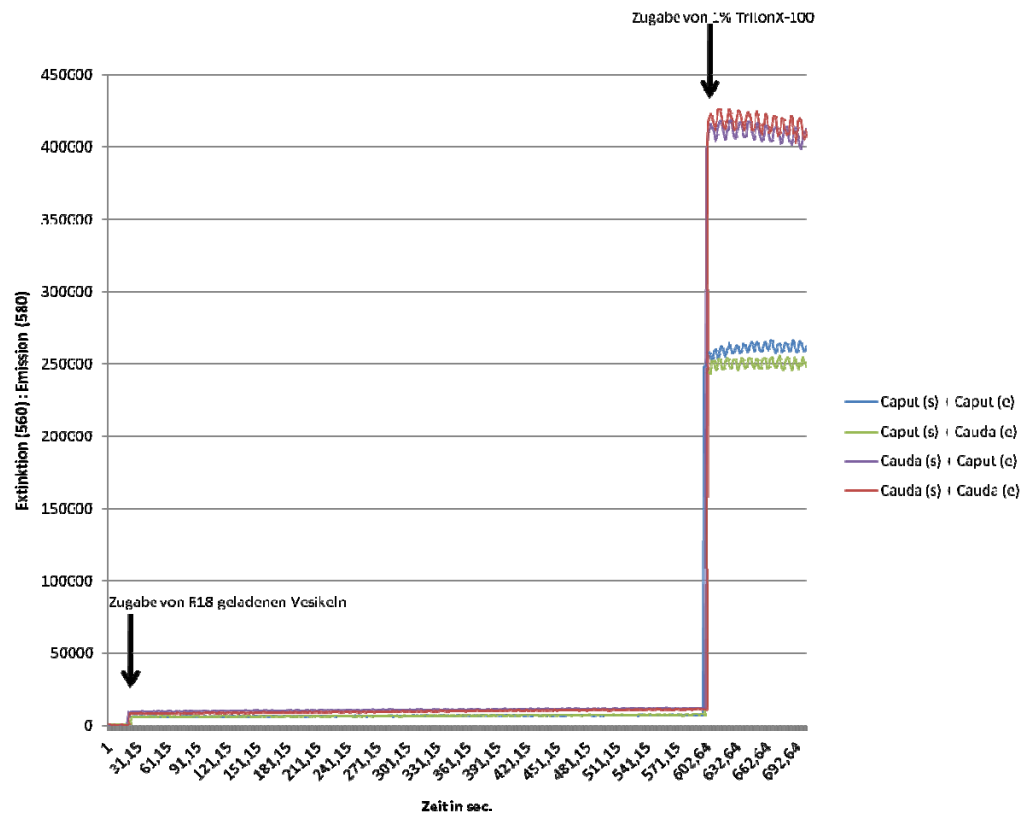


Abb. 45: Fluoreszenzmessung am Delta Scan Illuminationssystem (Emission $\lambda = 580$, Extinktion $\lambda = 560$). Nach Zugabe von R18 markierten Epididymosomen (e) (bei $t = 30$ sec.) zu unmarkierten bovinen Nebenhodenspermien (s) konnte ein Anstieg der Fluoreszenz gemessen werden. Die Messungen wurden im Puffer mit 0,32 mol/L Sucrose mit 2 mmol/L HEPES bei pH= 8 durchgeführt. Nach ca. $t = 600$ sec. erfolgte die Zugabe von 1% TritonX-100 (v/v, Endkonzentration), wodurch der maximale Fluoreszenzanstieg erreicht werden konnte. Die Abbildung zeigt exemplarisch eine Messung, von jeder Spermien/Vesikel-Kombination.

Tab. 12: Der prozentuale Fluoreszenzanstieg nach Zugabe (t= 30 sec.) R18 markierter Epididymosomen (e) zu bovinen Nebenhodenspermien (s) bei einem Proteinverhältnis von 2:1 (Spermien: Epididymosomen) in Abhängigkeit von der Zeit (t= 600 sec.). Die Fusion wurde mit dem Puffer 0,32 mol/L Sucrose mit 2 mmol/L HEPES bei pH= 8,0 durchgeführt. Nach ca. t= 600 sec. erfolgte die Zugabe von 1% TritonX-100 (v/v, Endkonzentration), wodurch der maximale (100%) Fluoreszenzanstieg erreicht wurde. Die prozentuale Fluoreszenz errechnete sich aus 4 unabhängig durchgeführten Messungen (n= 4). Die prozentuale Fusion wurde aus der prozentualen Fluoreszenz mit der Formel $F = FI \times (I+r)/I$ nach Corazzi et al. 1991 abgeleitet (siehe Kap. 2.3.1.4; S. 29).

pH 8																				
Zeit in sec.	30	60	120	150	180	210	240	270	300	330	360	390	420	450	480	510	540	570	600	Triton-X
Caput (s) + Caput (e)																				
Fluoreszenz in %	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	1%	1%	1%	1%	1%	1%	1%	1%	1%	1%	100%
Fusion in %	0%	0%	0%	0%	0%	0%	1%	1%	1%	1%	1%	1%	1%	1%	1%	1%	1%	1%	2%	
SE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Cauda (s) + Cauda (e)																				
Fluoreszenz in %	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	1%	100%
Fusion in %	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	1%	1%	1%	1%	1%	1%	1%	
SE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Caput (s) + Cauda (e)																				
Fluoreszenz in %	0%	0%	0%	0%	1%	1%	1%	1%	1%	1%	1%	1%	1%	1%	1%	1%	1%	1%	2%	100%
Fusion in %	0%	0%	1%	1%	1%	1%	1%	1%	1%	1%	1%	1%	2%	2%	2%	2%	2%	2%	2%	
SE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Cauda (s) + Caput (e)																				
Fluoreszenz in %	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	1%	1%	1%	1%	1%	1%	1%	1%	100%
Fusion in %	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	1%	1%	1%	1%	1%	1%	1%	1%	1%	1%	1%	1%	
SE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

Vermerk:

Die Seiten 124ff enthalten persönliche Daten. Sie sind deshalb nicht Bestandteil der Online-Veröffentlichung.